

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE

(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE)

DIREKTOR: PROF. DR. MED. O. ORTMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchungen zu direkten und indirekten Wirkmechanismen bei Target-spezifischer  
Behandlung von Mammakarzinomzellen unter Berücksichtigung des Her2- und Her4-  
Rezeptorexpressionsprofils**

INAUGURAL - DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MEDIZIN

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Florian Bitterer

2017



AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE

(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE)

DIREKTOR: PROF. DR. MED. O. ORTMANN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER

UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Untersuchungen zu direkten und indirekten Wirkmechanismen bei Target-spezifischer  
Behandlung von Mammakarzinomzellen unter Berücksichtigung des Her2- und Her4-  
Rezeptorexpressionsprofils**

INAUGURAL - DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MEDIZIN

der

Fakultät für Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Florian Bitterer

2017

---

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. vet. Anja-Kathrin Wege

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. rer. nat. Uwe Ritter

Tag der mündlichen Prüfung:

27.10.2017

## **SABINE UND MEINER FAMILIE**

Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen.

Albert Einstein

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Mammakarzinom .....	1
1.2	Die Rezeptor-Tyrosinkinasen der ErbB-Familie.....	3
1.2.1	Die Rezeptor-Tyrosinkinasen.....	3
1.2.2	Die ErbB-Rezeptoren .....	3
1.2.3	Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren.....	6
1.2.4	ErbB-Rezeptoren und ihre Rolle in der Tumorentstehung.....	8
1.3	Das Immunsystem in der Karzinogenese.....	13
1.3.1	Das humane Immunsystem - Ein Überblick .....	13
1.3.2	Natürliche Killerzellen .....	13
1.4	Zielgerichtete Tumorthherapie.....	19
1.4.1	Monoklonale, therapeutische Antikörper .....	20
1.4.2	Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib .....	24
1.4.3	Antihormonelle Therapie .....	25
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>Zelllinien und Materialien.....</b>	<b>28</b>
3.1	Untersuchte Zelllinien.....	28
3.2	Materialien .....	31
<b>4</b>	<b>Theoretische Grundlagen und Methoden.....</b>	<b>36</b>
4.1	Methoden der Zellkultivierung und Zellpräparation .....	36
4.1.1	Standardzellkultur .....	36
4.1.2	Retrovirale Transduktion von Mammakarzinomzellen .....	38
4.1.3	Untersuchung der epigenetischen Expressionsunterdrückung des Her4-Rezeptors .....	39
4.2	Durchflusszytometrische Methoden .....	41
4.2.1	Grundlagen der durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik .....	41
4.2.2	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse .....	45
4.2.3	Apoptose- / Nekrose-Messung mittels Annexin-V-Färbung .....	50
4.2.4	Oberflächenphänotypisierung .....	54
4.2.5	Antikörper-Bindungsfähigkeit von Mammakarzinom-Zelllinien .....	55
4.2.6	Intrazelluläre FACS- Färbung .....	57
4.2.7	Zellsortierung mittels Durchflusszytometer .....	58
4.3	Proliferations- u. Metabolismus-Untersuchungen mittels XTT-Assay .....	59
4.4	Proteinchemische Methoden .....	61
4.4.1	Gewinnung von denaturierten Zellextrakten .....	61
4.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay-Kit .....	61
4.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	62
4.4.4	Transfer aufgetrennter Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot) .....	62
4.4.5	Nachweis der Proteine durch Chemolumineszenz und densitometrische Quantifizierung.....	63
4.5	Molekularbiologische Methoden.....	64
4.5.1	Isolierung von Total-RNA aus Zellkultur mit dem RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN .....	64
4.5.2	Quantitative und qualitative Analyse der isolierten RNA.....	65

4.5.3	Reverse Transkription .....	66
4.5.4	Relativquantitative Real-Time PCR mit dem Light Cycler .....	67
4.5.5	Nested-PCR zur Isotype-Bestimmung des Fcγ-Rezeptors .....	69
<b>4.6</b>	<b>Echt-Zeit-Zellanalyse mit dem xCelligence-System (RTCA = real-time cell analyzer) .....</b>	<b>71</b>
<b>4.7</b>	<b>Mikroskopisch-Histologische Verfahren .....</b>	<b>74</b>
4.7.1	Giemsa-Färbungen von ADCC-Zellkulturen .....	74
4.7.2	Immunfluoreszenz .....	75
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>77</b>
<b>5.1</b>	<b>Direktes anti-Her2 Targeting von Mammakarzinomzellen .....</b>	<b>77</b>
5.1.1	Einfluss eines anti-Her2 Targetings auf die Zellproliferation .....	77
5.1.2	Einfluss eines anti-Her2 Targetings auf den Zellmetabolismus .....	78
5.1.3	Einfluss eines anti-Her2 Targetings auf die Zellvitalität .....	79
5.1.4	Charakterisierung der Stabilität der erworbenen Trastuzumab-Resistenz in BT-474 <sub>Res</sub> Zellen .....	80
5.1.5	Trastuzumab- und Pertuzumab-Bindungskapazität .....	80
<b>5.2</b>	<b>Immunologisches Potential therapeutischer Antikörper .....</b>	<b>82</b>
5.2.1	Phänotypisierung der NK 3.3 Zellen .....	82
5.2.2	xCelligence-Untersuchungen .....	85
5.2.3	Apoptose-Assays .....	88
5.2.4	Modulation der Effektivität und des Potentials der ADCC .....	91
<b>5.3</b>	<b>Charakterisierung und Modulation des Her4 Rezeptors .....</b>	<b>94</b>
5.3.1	Epigenetische Reaktivierung von Her4 als Tumorsuppressorgen .....	94
5.3.2	Transfektion von Her4 (JMaCyt1 u. JMaCyt2) .....	95
5.3.3	ErbB4-Expressionsprofil der untersuchten Zelllinien .....	105
5.3.4	Bindungskapazität des therapeutischen Antikörpers mAb1479 .....	108
5.3.5	Direkte zelluläre Wirkmechanismen des anti-Her4-Antikörpers mAb1479 .....	109
5.3.6	Indirekte, immunsystemvermittelte Wirkmechanismen des anti-Her4-Antikörpers mAb1479 .....	111
5.3.7	Murine Effektorzellen .....	116
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>120</b>
6.1	Potential und Limitation einer anti-Her2 gerichteten Antikörpertherapie .....	120
6.2	Prädiktive Bedeutung einer Her4-Coexpression bezüglich eines anti-ErbB2- bzw. anti-ER-Targetings .....	121
6.3	Die Bedeutung der natürlichen Killerzellen in der Antikörper-basierten Tumorthherapie .....	127
6.4	Potential von ErbB4 als Therapeutisches Target .....	132
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>137</b>
<b>9</b>	<b>Erklärung zur eigenhändigen Anfertigung .....</b>	<b>144</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>145</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>146</b>

a. e.	am ehesten
Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
Ag	Antigen
BCA	Bicinchoninsäure, 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, bicinchoninic acid
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
CD	Cluster of Differentiation, Unterscheidungsgruppen
CDC	Complement Dependent Cytolysis, Komplement-abhängiger Zelltod
CI	Cell Index
CIS	Carcinoma in situ
CSC	Cancer Stem Cells, Krebsstammzelle
DAC	5-Aza-2-Deoxycytidine
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E:T-Ratio	Effektorzell : Targetzell - Ratio
ECD	extrazelluläre Domäne
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen Response Element
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FRET	Fluoreszenz-Energietransfers
FSC	Forward Scatter
Her1-4	Human epidermal growth factor receptor 1 - 4
HLA	Human Leukocyte Antigen
i. d. R.	in der Regel
i. R.	im Rahmen
ICD	intrazelluläre Domäne
IGF	Insulin-like Growth Factor
INF	Interferon
KIR	Killer Ig-like receptor, Killerzell-Immunoglobulin-ähnlicher Rezeptor
mAk	Monoklonaler Antikörper
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MFI	mittlere Fluoreszenzintensitäten
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	mononukleäre Zellen



mSpl	murine spleen cells, murine Spleozyten, murine Milzzellen
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
NCR	natural cytotoxicity receptor, natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NRG	Neureguline
OD	optischen Dichte
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern, Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphat-gepufferter Salzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3-K/Akt	Phosphatidylinositol-3-Kinase-Proteinkinase B
PMT	Photomultiplier Tubes
PR	Phenolrot
Ras/MAP-K	Ras-Mitogen-Activated Proteine Kinase, Ras-Mitogen-aktivierte Proteinkinase
RIP	regulierte intramembranöse Proteolyse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RTCA	Real-Time Cell Analyser
RT-CES	Real Time Cell Electronic Sensing
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s. c.	subcutan
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SEM	Standard Error of the mean, Standardfehler
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
sog.	so genannt
SPF	S-Phase-Fraktion
SSC	Side Scatter
Tab.	Tabelle
TACE	TNF-alpha-converting enzyme
Taq	Thermus aquaticus
TIC	Tumor Initiating Cell, tumorauslösende Zelle
TRAIL	Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand
TSA	Trichostatin A
u. a.	unter anderem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 DAS MAMMAKARZINOM

Im Fokus der aktuellen präklinischen Forschung sowie auch zunehmend im klinischen Alltag steht bei onkologischen Patienten eine „personalisierte Therapie“, also maßgeschneiderte Behandlungsstrategien entsprechend der spezifischen Charakteristika des jeweiligen Patienten und angepasst an die Biologie des Tumors. Ermöglicht wurden diese zielgerichteten Therapieoptionen durch die Entdeckung und Charakterisierung spezifischer Rezeptoren und Signalwegen, die eine Unterscheidung von entarteten und gesunden Zellen erlaubt.

Trotz signifikanter Verbesserungen des Patientenoutcomes mit der Einführung dieser Target-spezifischen Therapeutika (vgl. auch Kap. 1.4), lässt sich im klinischen Alltag leider häufig ein Therapieversagen bereits von Anfang an oder im Behandlungsverlauf beobachten. Vor diesem Hintergrund ist es Ziel zahlreicher translationaler Forschungsbemühungen mehr über die Hintergründe, Ursachen und zellulären Wege herauszufinden, auf denen solche Resistenzentwicklungen beruhen.

Ziel dieser Arbeit war es hierbei insbesondere die Rolle des Immunsystems und einer parallelen Coexpression weiterer ErbB-Rezeptoren als Ursache einer Resistenzentstehung zu beleuchten sowie damit verbundene mögliche Ansätze für neue (Kombinations-)Therapien zu eruieren.

### Epidemiologie

Das Mammakarzinom, die maligne Entartung der Brustdrüse, war im Jahr 2010 mit einem prozentualen Anteil von ca. 30 % aller weiblichen Krebserkrankungen die mit Abstand häufigste Tumorerkrankung der Frau<sup>1,2</sup>.

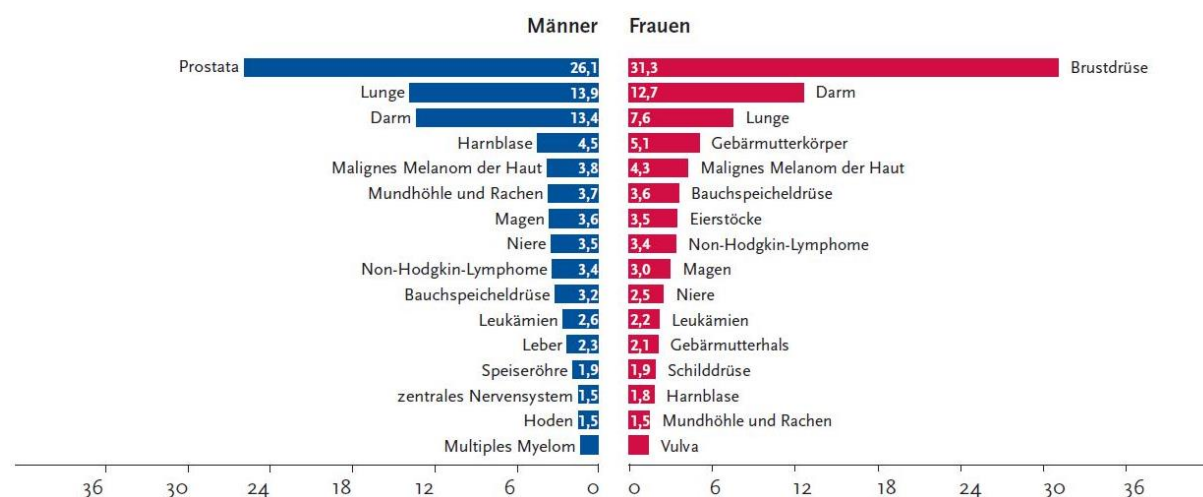


Abb. 1 Inzidenzraten der häufigsten Tumorentitäten in Deutschland im Jahr 2010. [entnommen aus Kaatsch et al.<sup>2</sup>]

Etwa eine von acht Frauen in den westlichen Industrieländern erkrankt im Verlauf ihres Lebens an Brustkrebs, während nur ca. 1 % aller Patienten männlichen Geschlechtes sind<sup>2</sup>. Deren Erkrankungszeitpunkt liegt jedoch meist im höheren Alter und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden.

Bei deutlich steigender Zahl der Neuerkrankungen, mit einer prognostizierten Inzidenz in Deutschland im Jahr 2014 von über 75.000 Frauen, haben sich die Heilungschancen in den vergangenen Jahren deutlich gebessert. Nicht zuletzt aufgrund des seit 2005 eingeführten Mammographie-Screenings und verbesserter Therapieoptionen, versterben heute weniger Frauen an Brustkrebs als noch vor 10 Jahren. Im Jahr 2009/2010 betrug die absolute 5-Jahres-Überlebensrate 79 % aller erkrankten Frauen. Dennoch stellt das Mammakarzinom

weiterhin mit 17,4 % die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Frauen und im Alter zwischen 40 - 55 Jahren sogar die häufigste Todesursache überhaupt dar.

Der statistische Altersgipfel der Neuerkrankungen liegt bei Frauen im Alter zwischen 60 und 80 Jahren, während Neuerkrankungen jedoch bei Frauen jeden Alters vorkommen. Mit einem Altersmedian von 64 Jahre und einer Erstdiagnose vor dem 45. Lebensjahr bei jeder zehnten Frau liegt das Manifestationsalter bei Brustkrebs deutlich unter dem anderer Tumorarten<sup>1,2</sup>.

### **Ätiologie und Risikofaktoren**

Das Mammakarzinom ist ätiologisch eine heterogene Erkrankung. Aufgrund intensiver Forschungsbemühungen in den vergangenen Jahrzehnten wurden zwar eine Reihe von Risikofaktoren (vgl. Tab. 1) und molekularen Mechanismen herausgearbeitet, die genauen Gründe für das Auftreten eines Mammakarzinoms sind jedoch weiterhin nicht geklärt.

#### **Risikofaktoren für das Auftreten eines Mammakarzinoms**

- frühe Menarche, späte Menopause
- Nulliparität, höheres Alter bei der ersten Geburt
- postmenopausale Hormonersatztherapie (v. a. östrogen- und gestagenhaltig)
- Adipositas und Bewegungsmangel
- C2- und Nikotin-Abusus
- Mastopathie
- genetische Prädisposition, wie BRCA<sub>1/2</sub>-Mutation
- fortgeschrittenes Lebensalter
- kontralaterales Mammakarzinom

**Tab. 1 Risikofaktoren für das Auftreten eines Mammakarzinoms.** [modifiziert nach Siegel et al.<sup>1</sup> und Kaatsch et al.<sup>2</sup>]

Auf Grundlage zahlreicher Studien lassen sich die ätiologischen Faktoren des Mammakarzinoms auf genetische, hormonelle, morphologische, soziale und strahlenbedingte Einflüsse zurückführen<sup>3</sup>.

Rein hereditären Ursprungs mit einer Mutation der „klassischen“ autosomal-dominanten Brustkrebsgene BRCA1 und BRCA2 oder des p53-Gens scheinen nur 5 - 10 % der Mammakarzinome zu sein<sup>4</sup>. Der überwiegende Anteil tritt hingegen spontan auf. Bei diesen über 90 % der Patientinnen beeinflussen hingegen v. a. Umweltfaktoren das Erkrankungsrisiko. Entsprechend erhöht eine frühe Menarche bzw. eine späte Menopause, sowie die Einnahme einer Hormonersatztherapie auf Basis einer Östrogen/Gestagen-Kombination die Erkrankungswahrscheinlichkeit, während das Risiko bei mehreren bzw. frühen Geburten sinkt. Auch Übergewicht, Aktiv- und Passivrauchen sowie vermehrter Alkoholkonsum besitzen einen negativen Einfluss<sup>5</sup>.

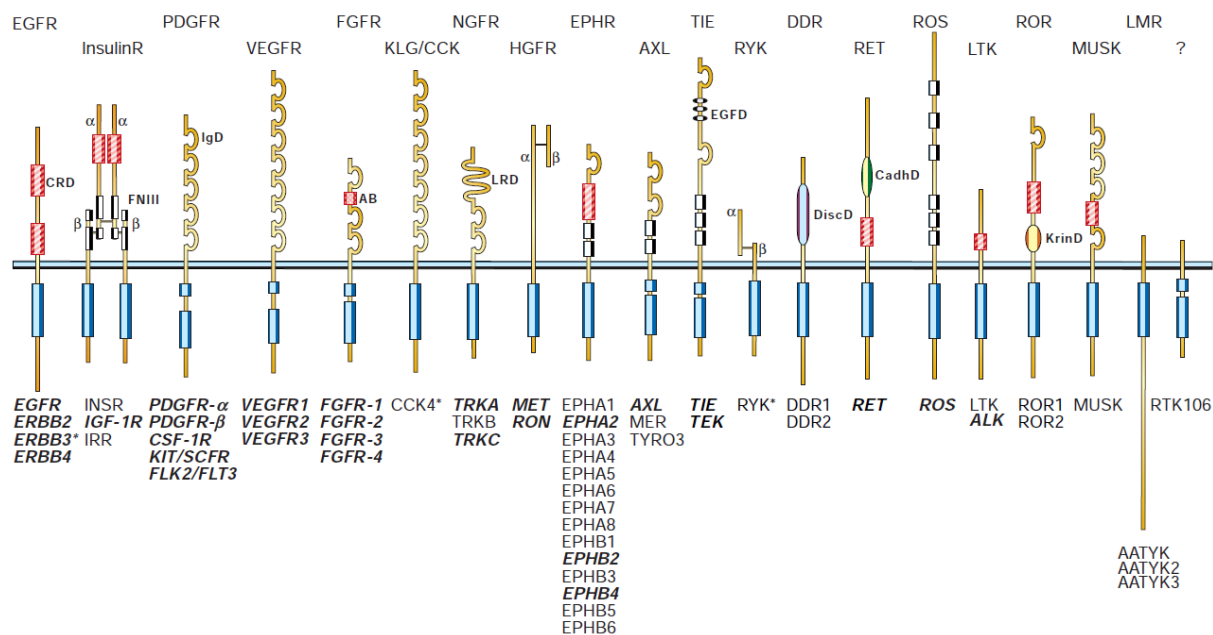
Wie bei vielen anderen Tumorerkrankungen ist eine positive Familienanamnese, ein Karzinom der kontralateralen Seite oder eine Präkanzerose im Sinne eines lobulären bzw. duktales Carcinoma in situ (CIS) mit einem erhöhten Risiko assoziiert. Auch bestimmte gutartige Brustveränderungen, wie eine lobuläre Neoplasie oder eine atypische duktales Hyperplasie, konnten als Risikofaktoren identifiziert werden<sup>6</sup>.

## 1.2 DIE REZEPTOR-TYROSINKINASEN DER ERBB-FAMILIE

### 1.2.1 Die Rezeptor-Tyrosinkinasen

Die Familie der ErbB-Rezeptoren gehört zur Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), die strukturell aus einer einzigen Transmembran- $\alpha$ -Helix besteht, die das C-terminale Ende im Zellinneren mit den extrazellulären ligandenbindenden Domänen des Rezeptors verbindet<sup>7,8</sup>. Alle bekannten RTKs - mit Ausnahme des dimeren Insulin-Rezeptors - besitzen eine Monomer-Struktur<sup>8,9</sup>.

In der Literatur sind über 50 humane RTKs beschrieben, die sich anhand des Aufbaus ihrer extrazellulären Domäne und der intrazellulären Tyrosinkinase in 20 Subfamilien klassifizieren lassen<sup>9,10</sup>.



**Abb. 2 Zusammenstellung des strukturellen Aufbaus der 20 Subfamilien der humanen Rezeptortyrosinkinasen.** Die Mitglieder der einzelnen Subfamilien sind jeweils unter dem Hauptvertreter aufgeführt. [entnommen aus Blume-Jensen et al.<sup>10</sup>]

Als sog. „single-pass-Rezeptoren“ übernehmen die RTKs zentrale Aufgaben in der Regulation der zellulären Proliferation, Apoptose, Migration, Adhäsion oder der Differenzierung<sup>9,11</sup>. Kommt es jedoch zu einer Mutation oder einer Überexpression der Rezeptortyrosinkinasen, bedingt dies nicht selten eine maligne Transformation des betroffenen Gewebes. Entsprechend ist für über 50 % der bekannten RKTs - jeweils in veränderter Form - eine Assoziation zu humanen Tumoren beschrieben<sup>10</sup>.

### 1.2.2 Die ErbB-Rezeptoren

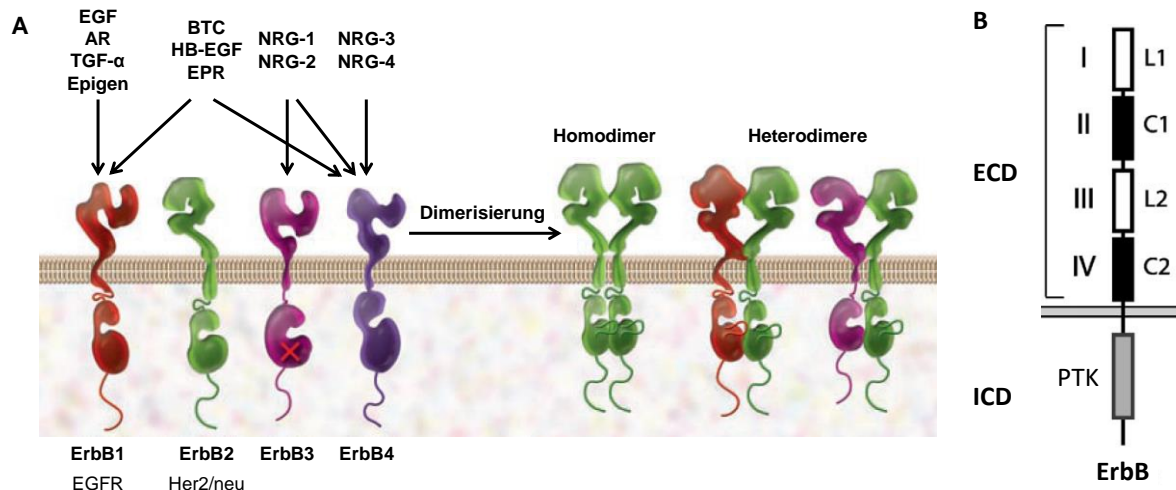
Vier eng verwandte epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptoren fasst die Familie der ErbB-Rezeptoren, die zur Subklasse I der Rezeptortyrosinkinasen gehört, zusammen: den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR, auch ErbB1 oder Her1 genannt, den ErbB2 (Her2), den ErbB3 (Her3) und den ErbB4 (Her4).

Der EGFR wurde 1978 von G. Carpenter als erster Vertreter dieser Rezeptorklasse als 170 bis 185 kDa schweres, transmembranäres Glykoprotein mit Tyrosinkinase-Aktivität beschrieben<sup>12</sup>.

Die ErbB-Rezeptoren übernehmen in Epithelien aber auch in zahlreichen mesenchymalen und neuronalen Geweben vielfältige Aufgaben, sowohl in der embryonalen Entwicklung, als auch im adulten Organismus. Sie können jedoch auch mit einer Tumorentstehung und dessen Progression assoziiert werden<sup>7,11</sup>.

### 1.2.2.1 Liganden der ErbB-Rezeptorfamilie

Für alle Rezeptoren, außer den ErbB2-Rezeptor, sind verschiedene extrazelluläre Liganden unterschiedlicher Affinität und Spezifität bekannt und in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst. All diese Bindungsproteine zeichnen sich durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zum EGF aus, die in einer 60 Aminosäuren langen, trihelikalen Tertiärstruktur konserviert ist<sup>13</sup>.



**Abb. 3 A: Die Familie der ErbB-Rezeptoren und ihre Liganden.** [modifiziert nach Marmor et al.<sup>7</sup> und Zhang et al.<sup>14</sup>]  
**B: Aufbau der ErbB-Rezeptoren.** [modifiziert nach Warren et al.<sup>15</sup>]

**A:** ErbB-Rezeptoren bestehen strukturell aus einer einzigen Transmembran- $\alpha$ -Helix, die das C-terminale Ende im Zellinneren mit den extrazellulären, ligandenbindenden Domänen des Rezeptors verbindet. Die intrazelluläre Region enthält die Tyrosinkinasedomäne und ein ihr angrenzendes autophosphorylierendes Ende. Lediglich die Tyrosinkinasedomäne des ErbB3 ist katalytisch inaktiv. Zudem werden 11 ErbB-Liganden mit ihren assoziierten Rezeptoren dargestellt: EGF, AR, TGF $\alpha$  und Epigen binden an ErbB1; BTC, HB-EGF und EPR binden sowohl an ErbB1 als auch an ErbB4; die Neureguline (auch Hereguline genannt) NRG-1 und NRG-2 binden an ErbB3 und ErbB4; NRG-3 und NRG-4 wiederum binden nur an ErbB4. Für ErbB2 ist mutationsbedingt kein Ligand bekannt. Kompensiert wird dies durch eine konstitutionell vorhandene Dimerisierungsschleife und einer konsekutiven ligandenunabhängigen Aktivität.

**B:** Die extrazelluläre Domäne (ECD) enthält die Liganden-Bindedomänen I und III bzw. L1 und L2 sowie die Cystein-reichen Domänen II und IV bzw. C1 und C2 für die Ausbildung der Dimerisierungsschleifen. Die intrazelluläre Domäne (ICD) besteht u.a. aus der Protein-Tyrosinkinase (PTK).

Im Jahr 2000 führten Olayioye et al. eine Klassifizierung dieser ErbB-Liganden in drei Gruppen ein, die sich in der Rezeptor-Spezifität begründet<sup>16</sup>.

- Der ersten Gruppen werden der Epidermal Growth Factor (EGF), Amphiregulin (AR), der Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) sowie Epigen zugeschrieben. Sie alle binden spezifisch an den EGFR.
- Liganden, die eine übergreifende Spezifität für zwei und mehrere Rezeptoren aufweisen, gehören zur zweiten Klasse. So binden Betacellulin (BTC), der heparinbinding EGF-like Growth Factor (HB-EGF) und Epiregulin (EPR) sowohl an EGFR als auch an Her4.
- Die dritte Ligandengruppe bildet die Subfamilie der sog. Hereguline (HRG) bzw. Neureguline (NRG). NRG-1 und NRG-2 binden an ErbB3 und ErbB4, während NRG-3 und 4 spezifisch gegen den ErbB4-Rezeptor gerichtet sind<sup>7,11</sup>.

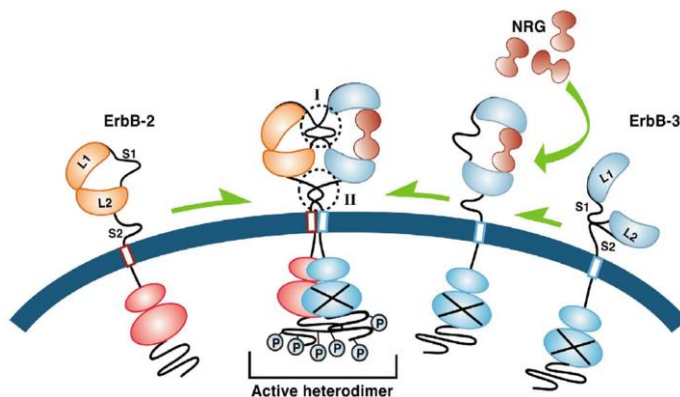
Diese übergreifende Selektivität gepaart mit der Rezeptorinteraktion zwischen den verschiedenen ErbB-Rezeptoren triggern verschiedenen, intrazelluläre Signalwege und kontrollieren verschiedene zelluläre Prozesse (s. o.). In ihrer Gesamtheit stellen die ErbB-Rezeptoren (und die zugehörigen, nativen Liganden) eine komplex regulierten, funktionelle Signaleinheit dar.

### 1.2.2.2 Rezeptorphysiologie

Als RKTs der Subklasse I bringen ErbB-Rezeptoren neben der intrazellulären Tyrosinkinase am C-Terminus aus einer glykosylierten, extrazellulären Domäne, die sich in vier Subdomänen untergliedert, mit: Jeweils zwei leucinreiche Domänen dienen der Ligandenbindung (L1, L2 bzw. I und III), während die beiden cysteinreichen Sequenzen (S1, S2 bzw. II und IV) die „Dimerisierungsschleife“ ausbilden<sup>17</sup>.

ErbB-Rezeptoren liegen je nach Aktivierungszustand in zwei verschiedenen Konformationen vor. In der inaktiven Form liegen der EGFR, der Her3 und der Her4-Rezeptor als Monomer mit einer geschlossenen inaktiven extrazellulären Domäne vor. Erst eine Ligandenbindung initiiert die Rezeptoraktivierung, die über eine Konformationsänderung zur Freilegung des sog. „Dimerisierungsarms“ in der Subdomäne II (= S) führt und somit dessen Interaktion mit einer Subdomäne II eines benachbarten ErbB-Rezeptors ermöglicht<sup>17</sup>. Diese laterale Wechselwirkung zweier Rezeptoren wird als Homo- bzw. Heterodimerisierung bezeichnet.

Die Konformationsänderung der ErbB-Rezeptoren führt zudem zu einer Annäherung der beiden Liganden-Bindungsdomänen I und III und auf diese Weise zu einer verstärkten Signalweiterleitung. Auch wurden genuine, also nicht durch Liganden induzierte ErbB-Dimere auf der Zelloberfläche beschrieben, bei denen jedoch erst eine nachfolgende Bindung zu einer Aktivierung der zytosolischen Kinasedomäne führt<sup>18</sup>.



**Abb. 4 Rezeptorphysiologie der Liganden induzierten ErbB-Rezeptoren-Aktivierung.**

Nach Ligandenbindung kommt es zur Konformationsänderung der extrazellulären Domänen mit Ausbildung eines sog. Dimerisierungsarm und konsekutiv zur Homo- bzw. Heterodimerisierung mit einem weiteren Vertreter dieser Rezeptorenfamilie. Resultat ist schließlich die Aktivierung der intrazellulären Rezeptortyrosinkinasen und die Trans-Autophosphorylierung der intrazellulären Domänen.

Zudem zeigt die schematische Darstellung der Domänenstruktur die Her-Rezeptoren mit den beiden leucinreichen Ligandenbindungsdomänen (L1, L2 bzw. I und III) und den beiden cysteinreichen Sequenzen (S1, S2 bzw. II und IV).

[entnommen aus Citri et al.<sup>19</sup>]

Erst mit Ausbildung dieser Dimerisierungsschleife kommt es zum weiteren Signaling über die Aktivierung assoziierter Tyrosinkinasen. Diese autophosphorylieren jeweils gegenseitig im C-terminalen Bereich der intrazellulären Domäne regulatorische Threonin-, Serin- und Tyrosin-Reste ihres Interaktionspartners (sog. Transphosphorylierung)<sup>8,9</sup>. Das damit gesteigerte RTK-Niveau initiiert im Folgenden die weitere intrazelluläre Signaltransduktionskaskade, indem hierdurch intrazelluläre downstream-Signalmoleküle (Mediatoren, Adapterproteine) wie Grb2, Src oder PKC ihrerseits über eine Phosphorylierung aktiviert und ins Zellinnere weitergeleitet werden<sup>11,20</sup>.

Bei maligne entarteten Zellen existiert aufgrund einer Rezeptorüberexpression, neben diesem klassischen Weg der Rezeptoraktivierung, die Möglichkeit einer ligandenunabhängigen Aktivierung<sup>21</sup>. Ausnahmen dieser klassischen Rezeptorphysiologie weisen sowohl der ErbB2- als auch der ErbB3-Rezeptor auf. Ihre Besonderheiten werden im Folgenden dargestellt:

### ErbB2

Der 1985 erstmals von der Arbeitsgruppe um Axel Ullrich beschriebene Her2-Rezeptor bindet aufgrund einer mutationsbedingten strukturellen Blockade der eigentlichen Ligandenbindungssubdomäne keine aktivierenden Liganden<sup>11,22</sup>. Dieser Umstand wird jedoch dadurch kompensiert, dass die Konformation der Ektodomäne dieses Rezeptors der ligandenaktivierten offenen Struktur des EGFRs gleicht und somit konstitutionell eine Dimerisierungsschleife vorhanden ist<sup>22,23</sup>. Vor diesem Hintergrund erklärt sich, dass der ErbB2-Rezeptor



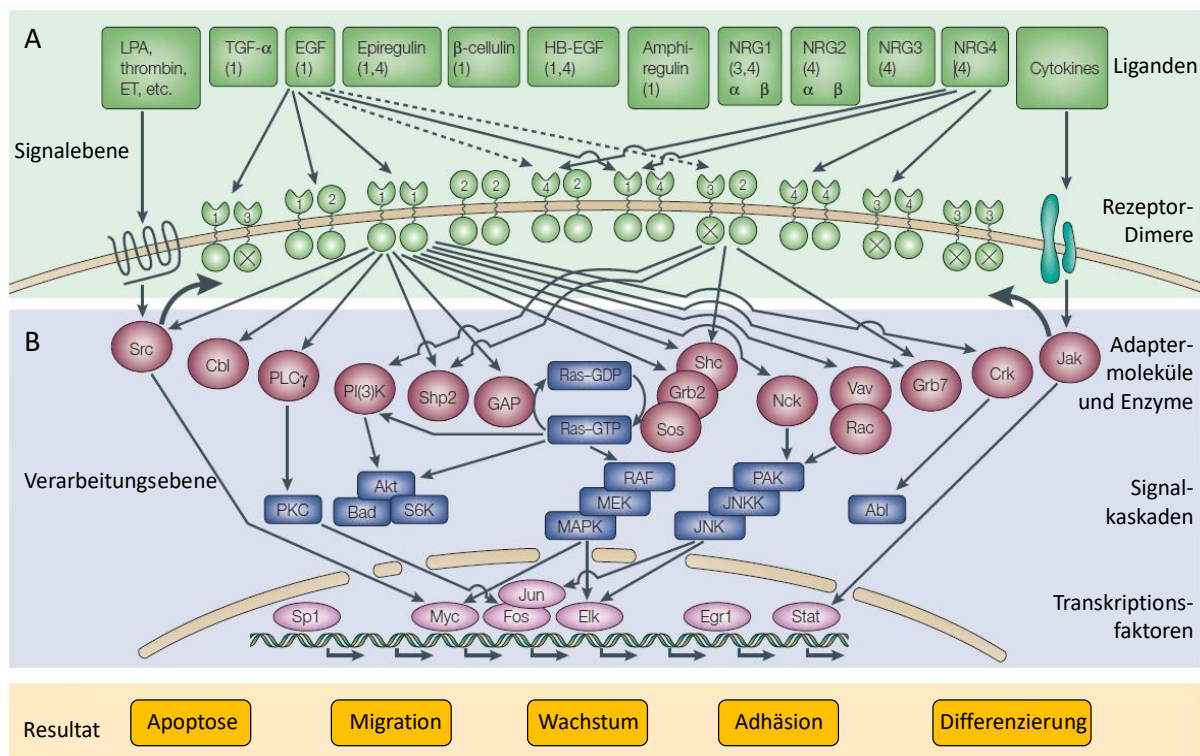
ebenso dimerisieren kann und sogar den bevorzugten Corezeptor für die Interaktion mit anderen ErbB-Rezeptoren (v. a. des ErbB3 und ErbB4) darstellt. In diesem Zusammenhang ist auch die beschriebene stärkere Signaltransduktion von ErbB2-Rezeptor enthaltenden Dimeren zu werten, da sich diese durch eine ausgeprägte Ligandenbindungsaffinität mit einer gleichzeitig erniedrigten Dissoziations- sowie einer kleineren Endozytoserate auszeichnen<sup>19,24</sup>.

## ErbB3

Der ErbB3-Rezeptor wurde 1989 durch Kraus et al. erstisoliert und mit hoher Homologie zum EGF- und ErbB2-Rezeptor charakterisiert<sup>25</sup>. Trotz einer extrazellulären Ligandenbindung ist der Her3-Rezeptor aufgrund einer Punktmutation innerhalb seiner PTK-Domäne nicht katalytisch aktiv<sup>19</sup>. Erst die Interaktion mit einem anderen ErbB-Vertreter führt über eine Transphosphorylierung von Her3 zu dessen Aktivierung<sup>24,26</sup>.

### 1.2.3 Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren

Die Aktivierung des komplexen zellulären Downstreamsignalings in Folge der Liganden-induzierten Rezeptordimerisierung und konsekutiven Transphosphorylierung der intrazellulären Domäne stößt eine Vielzahl spezifischer Signalwege an<sup>9,11</sup>.



**Abb. 5 Das komplexe Netzwerk der ErbB-Signaltransduktion.** [modifiziert nach Yarden et al.<sup>11</sup>]

**A:** Zusammenstellung der zehn möglichen dimeren ErbB-Rezeptorkombinationen mit ihren Liganden. Die in Klammern angegebenen Zahlen verweisen auf den jeweiligen hochaffinen ErbB-Rezeptor. Die Sonderstellung des ErbB2- bzw. ErbB3-Rezeptors begründet sich zum einen darin, dass Ersterer keine Liganden bindet, während der Her3-Rezeptor katalytisch inaktiv ist (gekreuzte Kinase-Domänen). Transregulation durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (wie jene für Lysophosphatidsäure (LPA), Thrombin und Endothelin (ET)) und Zytokin-Rezeptoren wird durch breite Pfeile dargestellt.

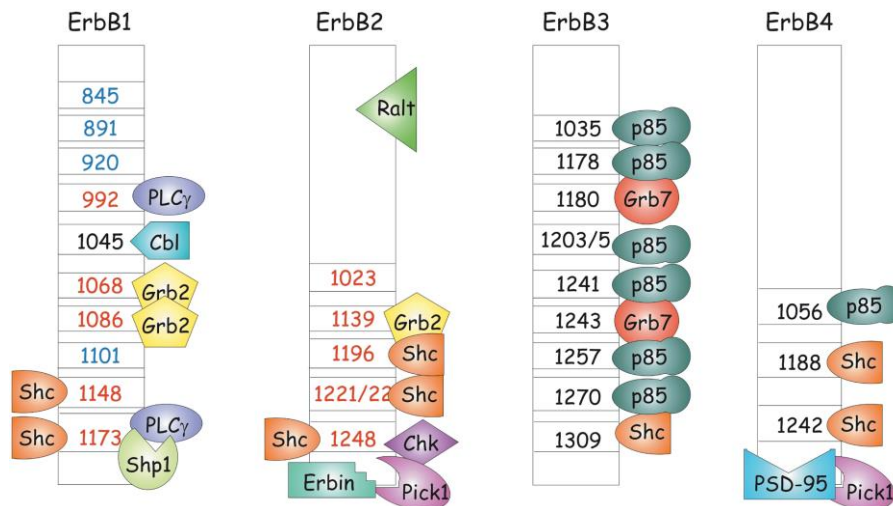
**B:** Intrazelluläre Signalweiterleitung. Zur Wahrung der Übersichtlichkeit wurden die möglichen Transduktionswege lediglich für das nur schwach mitogene ErbB1 Homodimer sowie für das relativ starke ErbB2-ErbB3-Heterodimer dargestellt.

Welche Signalkaskaden hierbei in welchem Ausmaß aktiviert werden, wird durch eine Reihe von zellphysiologischen Ursachen bestimmt. So bedingt der strukturelle Aufbau des C-terminalen Endes des jeweiligen ErbB-Rezeptors (ErbB1- ErbB4), wie auch der Dimerisierungspartner über dessen spezifisches Transphosphorylierungsmuster, welche zytosolischen Signalproteine, wie Grb2, Src oder PKC, über ihre SH2-

oder PTB-Domänen gebunden und somit unterschiedlich bevorzugt aktiviert werden<sup>27</sup>. Zudem beeinflusst auch der initiale extrazelluläre Ligand diesen ersten intrazellulären Signalschritt.

Dadurch, dass simultan mehrere dieser intrazellulären Mediatoren über einen einzigen ErbB-Rezeptor aktiviert werden können, erklärt sich auch, dass auch parallel mehrere Signalkaskaden induziert werden können. Diese Querverknüpfungen werden in Abb. 6 graphisch für die vier Vertreter der ErbB-Familie zusammengefasst.

Die beiden wichtigsten ErbB-Rezeptor-assoziierten Signalkaskaden, der Ras-mitogen-activated protein kinase (Ras/MAP-K) Signalweg sowie der Phosphatidylinositol-3-Kinase-Proteinkinase B (PI3-K/Akt) Signalweg werden in Abb. 5 schematisch und im Folgenden detailliert dargestellt:



**Abb. 6**  
**Zusammenstellung der**  
**ErbB-Rezeptoren mit**  
**ihren zytoplasmatischen**  
**Bindungsmediatoren.**  
[entnommen aus Olayioye  
et al.<sup>28</sup>]

## Ras / MAPK Singalweg

Die mitogenaktivierten Protein-kinasen (MAPKs) führen über eine mehrstufige Phosphorylierung verschiedener Moleküle zu einer Signalübertragung von der Zelloberfläche in den Zellkern. Hierbei sind alle phosphorylierten Vertreter der ErbB-Rezeptorenfamilie in der Lage über die beiden Adapterproteine GRB2 (Growth Factor Receptor Bound Protein 2) und SOS (Son Of Sevenless) das membrangebundene G-Protein Ras zu aktivieren. Über eine weitere serielle Phosphorylierungskaskade der Proteine Raf, Mek1 und Erk 1/2 werden schließlich verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert, die über eine modifizierte Genexpression i. d. R. einen proliferativen Effekt auf die Zellen vermitteln<sup>29</sup>.

## PI3K / Akt Singalweg

Der PI3K-Signalweg ist entscheidend für die Regulation der Zellmigration, der Adhäsion, der Proliferation sowie für das zelluläre Überleben. Die Aktivierung der Lipidkinase Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) induziert über einen mehrschrittigen Prozess die Proteinkinase-B (PKB, Akt). Diese phosphoryliert ihrerseits u. a. Bad (Bcl-2-Antagonist of Cell Death) und Caspase 9, was zur Deaktivierung dieser pro-apoptotischen Proteine und somit letztlich zur Inhibierung des natürlichen Zelltodes führt.

Des Weiteren wurde auch von Dobashi et al. ein proliferativer Effekt dieses Signalwegs über die Nebenstimulation des Proteins mTOR (mechanistic Target of Rapamycin) und den Forkhead-Transkriptionsfaktor beschrieben<sup>30</sup>.

Interessanterweise wird dieser Mechanismus von den verschiedenen Her-Rezeptoren in einem unterschiedlichen Ausmaß verwendet. Während ErbB4 über dessen regulatorischen Untereinheit p85 direkt PI3K aktivieren kann, benötigen der EGFR und der Her2-Rezeptor hierfür vermittelnde Adaptermoleküle wie p120<sup>cas</sup> oder Gab1<sup>28</sup>. Deshalb wird dieser Mechanismus von Letzteren eher in einem untergeordneten Maß verwendet<sup>7,11</sup>.



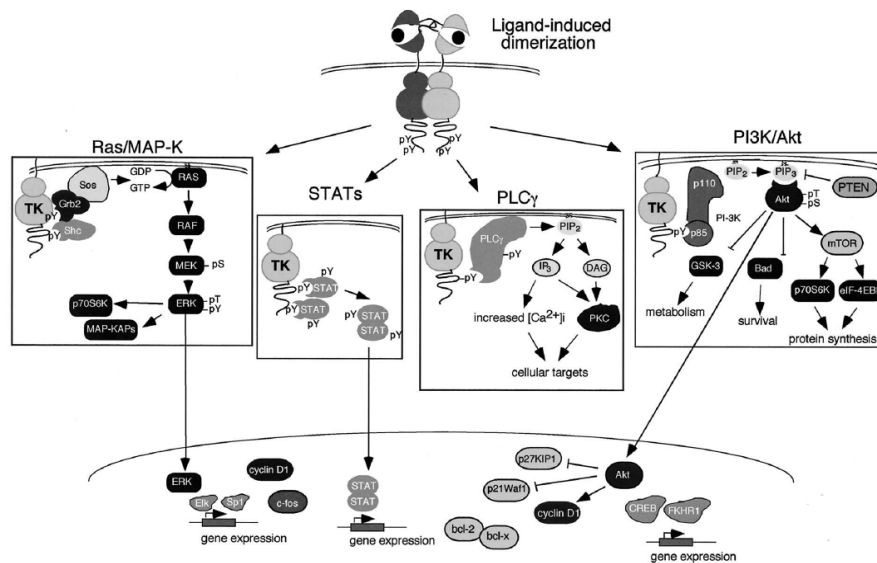


Abb. 7

### Übersicht über die Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren.

In Folge der Rezeptorhomo- bzw. heterodimerisierung kommt es zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase und der Phosphorylierung am C-terminalen Ende der ErbB-Rezeptoren. Über die nachfolgende Rekrutierung verschiedener Adapterproteine werden schließlich die weiteren Signaltransduktionswege wie der Ras-MAPK-, PI3K-Akt-, PLC-PKC- und den STAT-Weg angesteuert, die ihrerseits regulatorisch auf die Migration, das Zellüberleben und die Proliferation wirken.

[entnommen aus Marmor et al.<sup>7]</sup>

Ergänzt werden diese beiden beschriebenen Hauptmechanismen um weitere Erb-Rezeptor-gekoppelte Signalwege (vgl. auch Abb. 7). Hierzu zählen die Signalübertragung über die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ -PKC), die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT1, STAT3 oder STAT5 über den JAK/STAT-Protein-Weg (Janus-Kinase/signal transducer and activator of transcription) sowie das Signaling via der zyttoplasmatischen Tyrosinkinase c-src<sup>31</sup>.

Eine zusätzliche Komplexität erfährt dieses Signalnetzwerk, dadurch dass die resultierenden physiologischen Prozesse zudem über positive (+) und negative (-) Rückkopplungsschleifen reguliert werden können<sup>32</sup>. Auch die Aktivierung anderer Rezeptoren, wie z. B. der des Prolaktinrezeptors oder der der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) greifen in diese Signalkaskaden ein.

### 1.2.4 ErbB-Rezeptoren und ihre Rolle in der Tumorentstehung

Die ErbB-Rezeptoren sind über ihre zentralen Regulationsfunktionen entscheidend mit Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen, der Proliferation, der Migration, der Angiogenese oder dem natürlichen Zelltod assoziiert. Vor diesem Hintergrund erklärt sich ihre tragende Rolle bzgl. der Entstehung und dem Progress von Tumoren<sup>7,23,26,33</sup>.

Pathophysiologisch lässt sich diese maligne Entartung u. a. auf folgende zwei Aspekte zurückführen:

- Zum einen auf eine vermehrte Rezeptorenaktivität, beispielsweise aufgrund einer zugrundeliegenden genamplifikationsbedingten Überexpression<sup>34</sup> oder eines mutationsbedingten konstitutiven Rezeptorsignalings<sup>10</sup>.
- Zum anderen auf ein Ligandenüberangebot in Folge einer auto- oder parakrinen Überproduktion<sup>35</sup>.

#### 1.2.4.1 Die besondere Rolle des EGFR

Bereits 1978 beschrieben De Larco und Todaro die Bedeutung des EGFRs als allerersten Zellrezeptor für die Krebsentstehung<sup>36</sup>. Entsprechend klassifiziert der „Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology“ den EGFR gemeinsam mit ErbB3 und ErbB4 als potentiell Onkogen<sup>37</sup>. Dies lässt sich u. a. auch über seine enge strukturelle Ähnlichkeit zum viralen Oncogen v-erbB (Avian Erythroblastosis Virus) erklären<sup>23,38</sup>.

Folglich sind in der Literatur zahlreiche EGFR assoziierte Tumore beschrieben. Neben Tumoren der Blase, der Niere, des Kopf-Hals-Bereiches, der Prostata oder der Lungen, lässt sich auch bei Brustkrebs eine ErbB1-Überexpression nachweisen<sup>10,11,39</sup>. So wurde in verschiedenen Metaanalysen bei über 40 % aller Brustkrebspatientinnen ein erhöhtes EGFR-Niveau beschrieben<sup>40</sup>.

#### 1.2.4.2 Die besondere Rolle des ErbB2-Rezeptor beim Mamma-Karzinom

Der Her2-Rezeptor hingegen gilt als anerkanntes Onkogen für das Mammakarzinom<sup>37</sup>, der bei Überexpression<sup>34,41</sup> oder nach Heterodimerisierung mit dem ErbB3-Rezeptor<sup>26</sup> die Tumorzellproliferation fördert und mit einem schlechteren Patientenoutcome (= geringeres overall und disease-free survival), gesteigerten invasiven Tumorwachstum, vermehrter regionaler Tumorprogression sowie Fernmetastasierung assoziiert ist<sup>42</sup>.

Entsprechend lässt sich eine ErbB2-Überexpression in 20 - 30 % der Mammakarzinome nachweisen<sup>41</sup>, wird vermehrt jedoch auch bei anderen Tumorentitäten wie dem Ovarial-, Endometrialen-, Kolorektalen-, Ösophagogastralen-, Pankreas- oder Blasenkarzinom und bei nicht kleinzelligen Lungentumoren gefunden<sup>10,11,23,39</sup>.

Ursächlich für diese vermehrte Her2-Synthese ist in über 90 % der Fälle eine Genamplifikation, wobei das Ausmaß positiv mit dem Überexpressionsgrad korreliert<sup>41</sup>. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass bei 15 - 30 % der Patientinnen mit einem Her2-positiven Mammakarzinom ein konstitutiv aktiver Rezeptorstatus (verkürzt; 95 kDa) vorliegt, der nach proteolytischer Abspaltung eines Teil der extrazellulären Domäne entstand<sup>34,43</sup>. Zusammenfassend lässt sich somit eine Her2-Überexpression als gesicherter negativ prognostischer Marker für Brustkrebspatientinnen klassifizieren<sup>41</sup>.

Andererseits ergibt sich mit dem ErbB2-Rezeptor ein guter Ansatz für eine Target-spezifische Therapie. Auch da seine Überexpression einen positiven prädiktiven Wert für eine derartige Behandlung eröffnet. Im klinischen Einsatz werden hierzu die humanisierten monoklonalen Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) bzw. Pertuzumab (Perjeta®) verwendet, die an der extrazelluläre Her2-Domäne angreifen. Zusätzlich kommt der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (Tyverb®) als small molecule, das intrazellulär die Her2-vermittelte Signaltransduktion hemmt, zum Einsatz.

Nicht zuletzt auf diese modernen Behandlungsmöglichkeiten führten Siegel et al. - trotz konstanter Inzidenzrate für die USA - die signifikant reduzierte Mortalität beim Her2-positive Mammakarzinom in der vergangenen Dekade zurück<sup>1,44</sup>.

#### 1.2.4.3 Die besondere Rolle des ErbB4-Rezeptor beim Mamma-Karzinom

##### **Allgemeiner Aufbau und Expressionsprofil des ErbB4-Rezeptors**

Erst im Jahr 1993 wurde der Her4-Rezeptor als letztes Mitglied seiner Rezeptorenfamilie von G. Plowman und Kollegen isoliert<sup>45</sup>. Dieses 180 kDa schwere Glycoprotein weist eine große Gemeinsamkeit zu den übrigen ErbB-Rezeptoren auf. So entspricht die extrazelluläre Domäne fast vollständig der des Her3-Rezeptors, während der zytoplasmatische Anteil zu fast 80 % mit der des EGFRs und des Her2-Rezeptors übereinstimmt<sup>45</sup>.

Besonders in der Rezeptorphysiologie nimmt der Her4-Rezeptor jedoch, aufgrund seines besonderen Aufbaus, eine Sonderrolle ein. Er kann deshalb nicht nur über die unter 1.2.3 beschriebenen Signalkaskaden Ras/MAP-K und PI3-K/Akt in die nukleäre Regulation der Transkription eingreifen, sondern auch direkt aktivierend wirken. Die Grundlage dieses besonderen Signaling findet sich in einigen Her4-spezifischen Subdomänen.

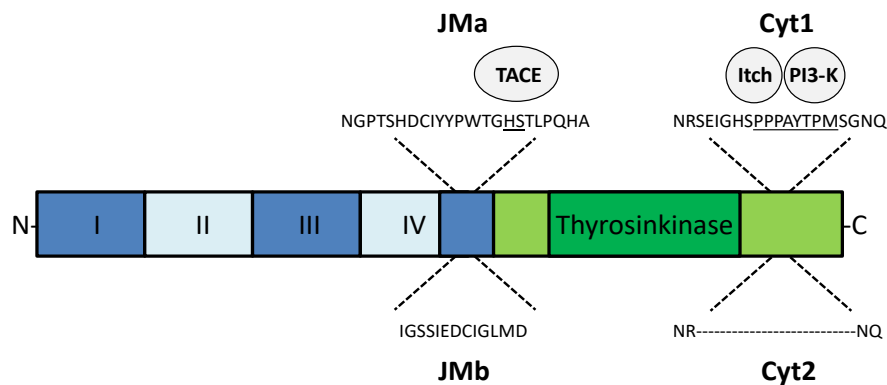
Insgesamt vier verschiedene Subtypen dieses Rezeptors sind bekannt, die sich aus der Kombination der beiden juxtamembranen Splicevarianten (JMa und JMb) sowie der zwei intrazellulären C-Termini (Cyt1 und Cyt2) ergeben: JMaCyt1, JMaCyt2, JMbCyt1 und JMbCyt2<sup>46,47</sup>. Diese unterscheiden sich sowohl in ihrem Aufbau als auch funktionell.

##### **Extrazelluläre Domäne**

Die beiden extrazellulären Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen des Exons 15 bzw. 16, wobei das Letztere für 23 Aminosäuren kodiert (JMa). Aus Exon 15 wird indes ein 13 Aminosäuren langes Protein translatiert (JMb).

Diese beiden Mitglieder der Her4-Rezeptorfamilie unterscheiden sich entscheidend in ihrer Rezeptorphysiologie. So beinhaltet nur die JMa-Unterform eine TACE-Bindungsstelle, weshalb nur hier nach einer Ligandenbindung oder stimuliert durch die Proteinkinase C in einem zweischrittigen Prozess die extrazelluläre sowie der intrazelluläre Domäne (ICD) abgespalten werden kann<sup>48</sup>. Dies erfolgt nach dem Prinzip der sogenannten regulierten intramembranösen Proteolyse (RIP), wobei die ADAM Metalloprotease TACE (TNF-alpha-converting enzyme, ADAM17) die Abtrennung eines 120 kDa schweren extrazellulären Fragments katalysiert. Dieser Schritt wird auch als Ektodomain-Shedding bezeichnet.

Das verbleibende membrangebundenen Spaltprodukt behält als transmembranes, 80 kDa Peptid (= m80) die Kinaseaktivität. Erst über einen zweiten Schritt - getriggert über die Aspartatprotease  $\gamma$ -Secretase - wird die intrazelluläre Domäne (4ICD) zytosolisch abgespalten<sup>49</sup>. Die JMb-Isoform hingegen gilt als Proteinase-resistent.



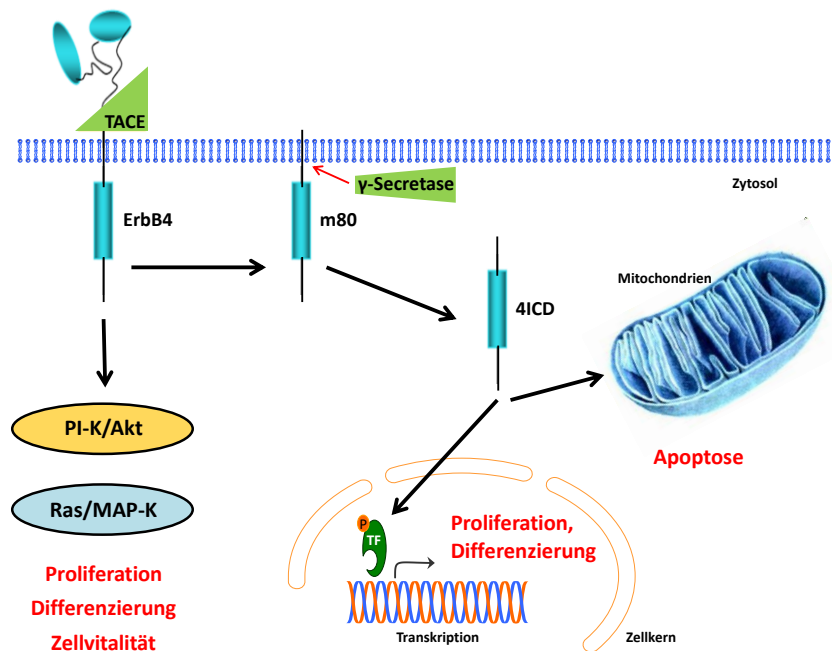
**Abb. 8 Splicevarianten des Her4-Rezeptors.** Durch alternatives Splicen des ErbB4-Gens entstehen vier verschiedene Isoformen des Her4-Rezeptors. Hierbei enthält die JMa-Domäne, im Gegensatz zu JMb, eine proteolytische Bindungsstelle für TACE. Die Cyt1-Domäne besitzt zudem eine sog. YTPM-Sequenz, über die eine direkte Interaktion mit dem PI3-K-Pathway oder der Ubiquitin Ligase Itch möglich ist. [modifiziert nach Hollmén et al.<sup>50</sup> und Sundvall et al.<sup>51</sup>]

### Intrazelluläre Domäne (4ICD)

Die beiden intrazellulären Isoformen (4ICD) unterscheiden sich ebenso in ihrem strukturellen Aufbau und ihrer Funktion. So besitzt nur CYT1 im Vergleich zu CYT2 eine sog. YTPM-Sequenz aus 16 Aminosäuren, die als Vermittler unter anderem zum PI3-K-Pathway, wie auch als Bindungsstellen für weitere Signalmoleküle, wie der Ubiquitin Ligase Itch dient<sup>51,52</sup>.

Demgegenüber kann Splicevarianten-unabhängig die 4ICD nach Abspaltung durch  $\gamma$ -Secretase, als lösliches 80 kDa großes Protein (s80) in den Zellkern transloziert werden<sup>53</sup>. Hier nimmt es u. a. als Chaperon aktivierenden oder hemmenden Einfluss auf die Transkription verschiedener Zielgene<sup>54</sup>, indem es eine Anreicherung von Transkriptionsfaktoren wie STAT5, YAP1 (YES associated Protein 1), ETO2 oder des ERE (Estrogen Response Element) fördert<sup>54,55</sup>.

Vor diesem Hintergrund erklärt sich auch die ambivalente Wirkungsweise des ErbB4-Rezeptors bzgl. des regulatorischen Einflusses auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen<sup>53,56</sup>. So kann 4ICD einerseits fördernd auf die Tumorprogression über die Steigerung pro-proliferativer Signale (=STAT5 oder ERE) wirken<sup>57,58</sup>, während sie ebenso tumorrepressiv über die Initiierung des natürlichen Zelltodes wirken kann. Hierzu interagiert s80 entweder über eine BH3-Domäne mit dem intrinsischen Apoptosesignalweg der Mitochondrien<sup>59</sup> oder aber es führt über eine Interaktion mit Hdm2 sowie der Ubiquitin Ligase Mdm2 zur Stabilisierung des Tumorsuppressorproteins p53, was sekundär zum natürlichen Zelltod führt<sup>60,61</sup>.



**Abb. 9**  
**Übersicht über die heterogene Funktion der Her4 assoziierten intrazellulären Mechanismen infolge einer regulierten intramembranösen Proteolyse (RIP).**  
 Nach Ligandenaktivierung kommt es infolge einer sequenziellen Spaltung durch die Enzyme TACE und  $\gamma$ -Secretase zur cytosolischen Freisetzung der intrazellulären Her4-Domäne (= 4ICD). Diese kann sowohl nach Translokation in die Mitochondrien Apoptose auslösen, als auch im Zellkern Einfluss auf die Genexpression nehmen.  
 [Graphik erstellt nach <sup>51</sup>, <sup>53</sup> und <sup>56</sup>]

Der Her4-Rezeptor wird in verschiedenen Geweben splicevariantenspezifisch exprimiert. Entsprechend ist in Nieren-, Tracheal-, Schilddrüsen-, Prostata- oder Brustdrüsen-Gewebe ausschließlich die JMa-Isoform nachweisbar. In kardialen Gewebe findet sich stattdessen v. a. der JMb-Typ. In neuronalem Gewebe treten hingegen wiederum beide Isoformen auf. Eine derartige gewebespezifische Expressionsprofil der intrazellulären Her4-Domänen (Cyt1 und Cyt2) findet sich hingegen nicht in der Literatur. Vielmehr scheinen beiden Formen jeweils in einem ausgeglichenen Maße vorhanden zu sein<sup>46,62</sup>.

Auch in einigen Tumoren ist der Her4-Rezeptor nachweisbar und nimmt hierbei eine entscheidende Rolle für die Genese, den klinischen Verlauf und z. T. für die Therapie ein<sup>10,11,23,39</sup>. Neben dem Mammakarzinom (vgl. unten) gilt dies besonders für ZNS-Malignome, für kolorektale und Plattenepithelkarzinome sowie für das maligne Melanom<sup>62,63</sup>.

### **Prognostische und prädiktive Bedeutung von Her4 für das Mammakarzinom**

Während der Zusammenhang einer vermehrten Her1-, Her2- und Her3-Expression bei Mammakarzinompatientinnen mit einem schlechteren Outcome von zahlreichen Autoren als gesichert angesehen wird<sup>26,40</sup> (vgl. auch 1.2.4.1 und 1.2.4.2), ist die prognostische und prädiktive Bedeutung einer Her4-Rezeptorexpression nach wie vor unklar<sup>51,64–66</sup>. Der umstrittene Stellenwert von ErbB4 drückt sich einerseits in seiner Rolle als Onkogen aus, andererseits werden ihm jedoch auch Eigenschaften als Tumorsuppressor zugeschrieben.

Diese uneinheitliche Bedeutung wird auch in verschiedenen klinischen Studien deutlich. Während u. a. V. Pawlowski et al. ein erhöhtes krankheitsfreies Überleben (= disease free survival) mit einer Überexpression von Her4 assoziierten<sup>67</sup>, konnten Bieche et al. in seiner Studienpopulation mit geringerer Her4-Expression ein erhöhtes Rezidiv-freies Überleben (= relapse-free survival) zeigen<sup>68</sup>. Zu einem vergleichbaren Ergebnis kamen Lodge et al., die Her4 ebenso als ungünstigen prognostischen Marker definierten<sup>69</sup>.

Eine mögliche Erklärung für diese inkonsistenten Ergebnisse findet sich zum einen in der äußerst heterogenen Datenlage zur Her4-Expression beim Mammakarzinom. So wird diese in der Literatur mit einem Anteil von 7 bis 58 % beschrieben<sup>67,70,71</sup>. Diese Ambivalenz scheint im alternativen Her4-Signaling begründet zu sein, das u. a. auf die differentielle Expression der vier bekannten Splicevarianten zurückzuführen ist<sup>56,72</sup>. Zudem scheint jedoch nicht nur die exprimierte Isoform, sondern auch ihre subzelluläre Lokalisierung entscheidend für die vom Her4 ausgelösten, zellulären Effekte zu sein. So beschrieben Elenius et al., dass der nukleäre Nachweis von Her4 (= 4ICD aus der Isoform JMa) im Gegensatz zur alleinigen Her4 Expression auf der Plasmamembran mit einer schlechteren Prognose in Verbindung steht ( $p = 0.04$ )<sup>57</sup>. Diesen postulierten Zusammenhang bestätigte

2009 die Arbeitsgruppe um Ann D. Thor. Auch hier konnte lediglich eine Assoziation zwischen einer zytosolischen, nicht jedoch mit einem nukleären Nachweis von Her4 mit einem besseren Gesamtüberleben ( $p < 0.004$ ) aufgezeigt werden<sup>58</sup>.

Pathophysiologisch interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch der Einfluss von Her4 auf das Expressionsniveau anderer Rezeptoren. So finden sich in der Literatur mehrere Belege für eine hohe Korrelation zwischen ErbB4-positiven Mammakarzinomen und einem positiven Hormonrezeptorstatus (ER und PgR) sowie einer ErbB2-Negativität<sup>73–75</sup>. Auch von Sundvall et al. konnten auf mRNA Ebene eine signifikante Reduktion des Proliferationsmarkers Ki-67 bei Her4-positiven Mammakarzinomen demonstriert werden<sup>51</sup>.

Zudem korreliert das Tumorgrading positiv mit der nachgewiesenen Her4-Menge, während eine Überexpression der weiteren Vertreter der ErbB-Rezeptorenfamilie (Her1-3) eher mit einem niedrigeren Differenzierungsgrad einhergeht<sup>67,70,73</sup>.

Neben dem prognostischen Stellenwert von Her4, rückt zunehmend seine prädiktive Rolle ins Zentrum verschiedener Untersuchungen. Auch hierbei übernimmt der ErbB4-Rezeptor eine duale Funktion.

Einerseits scheint eine vermehrte Expression dieses Proteins zu einem besseren Ansprechen von endokrinen und Target-spezifischen Therapeutika zu führen. Entsprechend konnte in mehreren klinischen Studien ein signifikanter Zusammenhang mit einem besseren Outcome nach Tamoxifen- sowie Trastuzumab-Behandlung beschrieben werden<sup>76,77</sup>.

Andererseits assoziieren andere Autoren eine Her4-Positivität mit dem Therapieversagen bei gewissen Tumoren. So beschrieb Mohd Nafi et al. vor Kurzem eine erworbene Trastuzumab-Resistenz und ein konsekutiv schlechteres Patientenoutcome bei Brustkrebspatientinnen, bei denen der Her4-Rezeptor vermehrt im Zellkern nachgewiesen werden kann<sup>78</sup>. Gilmour et al. wiesen ergänzend einen Zusammenhang zwischen einer hohen ErbB4-Expression und einer Cisplatin-Resistenz in Ovarialkarzinom-Zelllinie nach<sup>47</sup>.

## 1.3 DAS IMMUNSYSTEM IN DER KARZINOGENESE

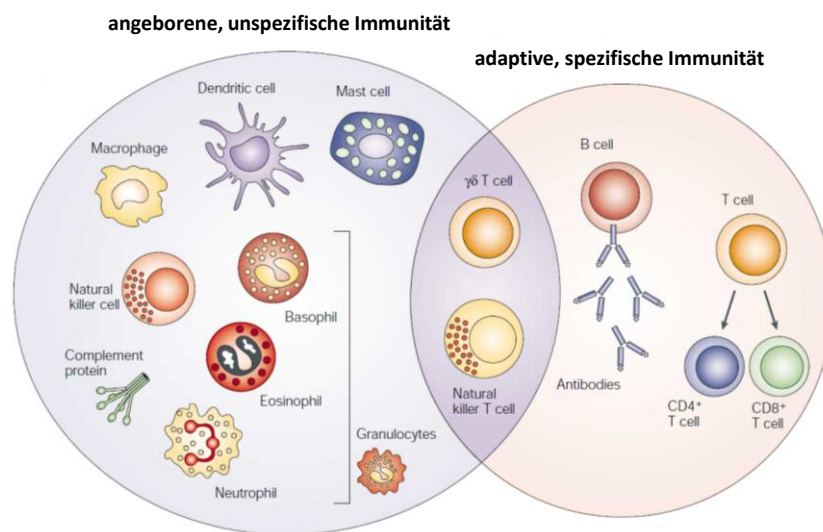
### 1.3.1 Das humane Immunsystem - Ein Überblick

Das Immunsystem schützt als komplexes Abwehrsystem den Organismus vor einer Vielzahl an Pathogenen, körperfremden Stoffe sowie körpereigenen entarteten Zellen, wobei es sich bei Menschen - wie bei allen höheren Vertebraten - in zwei sich ergänzenden Systemen untergliedert<sup>79</sup>.

Die angeborene bzw. unspezifische Immunität leistet als erstes Bollwerk sehr schnelle, aber unspezifische Abwehr gegen Pathogene. Die Grundlage der Pathogenidentifizierung erfolgt hierbei nicht erregerspezifisch, sondern unspezifisch über sog. „pathogen-associated molecular patterns (PAMP)“, also wenige, weit verbreitete strukturelle Muster von Mikroorganismen. Die zentralen Vertreter dieses Anteils des Immunsystems sind neben mechanischen Barrieren (= Epithelien) und dem Komplementsystem vor allen verschiedene Effektorzellen, wie die myeloiden Zellen mit den Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, die dendritische Zellen sowie die natürlichen Killerzellen.

Das adaptive bzw. spezifische Immunsystem reagiert in Folge der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses hingegen langsamer, dafür allerdings deutlich spezifischer und langanhaltender. Es besteht ebenfalls aus einem humoralen Anteil, mit antigenspezifischen Antikörpern, sowie einer zelluläre Komponente mit den T- und B-Zellen<sup>79</sup>.

Als Bindeglied zwischen diesen beiden Anteilen fungieren die sog. zytotoxisch NK-ähnlichen T-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen, da sie Aufgaben beider Immunsysteme übernehmen. Manche Autoren rechnen auch die natürlichen Killerzellen diesem Zwischenglied zu, da sie über Ihre Interaktion mit den Antikörpern des adaptiven Immunsystems auch pathogenspezifische Funktionen übernehmen<sup>80</sup>.



**Abb. 10**

**Überblick über das komplexe Zusammenspiel der beiden Anteile des humanen Immunsystems.**

Während die angeborene Immunität als erste Verteidigungslinie gegen Infektionen dient und aus dem Komplementsystem und verschiedenen Zellkomponenten besteht, reagiert die adaptive Immunabwehr deutlich verzögert. Sie bekämpft nach Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses mit Antikörpern sowie B- und T-Zellen Pathogene hochspezifisch und effektiv.

[modifiziert nach Dranoff et al.<sup>81</sup>]

### 1.3.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (= NK-Zellen) bilden mit 6 - 15 % der humanen, peripheren Blutlymphozyten eine entscheidende Effektorpopulation in der Kontakt-abhängigen, nicht-phagozytierenden, unspezifischen Abwehr einer Vielzahl von Pathogenen. Im Jahr 1979 wurden sie erstmals von E. Saksela und T. Timonen als große, granuläre Lymphozyten mit zytotoxischen Eigenschaften gegen Leukämiezellen („large granular lymphocytes“) beschrieben<sup>82,83</sup>. Im Gegensatz zu dieser rein morphologischen Definition, erfolgt heute die Differenzierung meist spezifischer über ihr Expressionsprofil als CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>-Zellen<sup>84</sup>. Die Expression des CD56-Oberflächenprotein, einem neuralem Zelladhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule; N-CAM) in Kombination mit der Abwesenheit des T-Zell-Rezeptormoleküls CD3 ist kennzeichnend für NK-Zellen. Obgleich CD56 als charakteristisch für NK-Zellen gilt, lässt sich dieses Oberflächenprotein auch bei anderen

Zellpopulation nachweisen<sup>85</sup>. Daher wird häufig NKp46 (CD335) zur Detektion von humanen NK-Zellen eingesetzt, der konstitutiv nur auf diesen Zellen exprimiert wird.

### **Bindeglied des Immunsystems**

NK-Zellen werden traditionell dem angeborenen Immunsystem zugerechnet. Sie nehmen jedoch funktionell eine Art Zwischenstellung ein. So beschrieb 2009 J. Sun natürliche Killerzellen als Bindeglied zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunität und wies ihnen adaptive Eigenschaften zu<sup>80</sup>. Funktionell besteht zwischen ihnen und T-Zellen eine enge Verwandtschaft, zudem stammen beide Zellklassen von einer gemeinsamen lymphoiden Knochenmarkvorläuferzelle ab<sup>86</sup>. Ergänzend wurden 2010 Hinweise veröffentlicht, dass NK-Zellen langlebige Gedächtniszellen ausbilden können, was einer klassischen Eigenschaft der adaptiven Immunität entspricht<sup>87</sup>. Phänotypisch sind NK-Zellen jedoch eindeutig über die fehlende CD3-Expression, einem zentralen Bestandteil des T-Zell-Rezeptor-CD3-Komplexes, abgrenzbar. Auch in ihrer Differenzierung unterscheiden sie sich deutlich. Während sich NK-Zellen direkt unter Umgehung einer Antigenprägung in primären Lymphorganen entwickeln, benötigen T-Zellen hierzu den Thymus.

### **Immunologische Bedeutung der NK-Zellen**

Natürliche Killerzellen übernehmen eine wichtige Rolle in der humanen Immunabwehr. Sie eliminieren nicht-antigenabhängig und ohne initiale Sensibilisierung entartete Zellen sowie pathogene Organismen. Hierbei orientieren sich die NK-Zellen insbesondere am Verlust der MHC-I-Expression der zu bekämpfenden Zellen, da diese bei Virusinfektion bzw. maligner Entartung vermindert wird bzw. verloren geht<sup>86</sup>. Im Gegensatz zu T-Zellen, die initial erst durch antigenpräsentierende Immunzellen aktiviert werden müssen, erkennen natürliche Killerzellen MHC-I<sup>negative</sup> Zellen direkt. Daneben vermitteln sie als wichtige Mediatoren regulatorische Aufgaben zwischen beiden Klassen der Immunität<sup>86</sup>.

#### **1.3.2.1 NK-Subpopulationen, Aktivitätssteuerung und NK-Zellrezeptoren**

Humane NK-Zellen untergliedern sich anhand ihrer CD56-Expression in zwei verschiedene Hauptpopulationen: In die immunregulatorische CD56<sup>high</sup>- und die zytotoxische CD56<sup>dim</sup>-Zellfraktion<sup>88</sup>. Letztere bildet dabei als nur schwach CD56 exprimierende NK-Zellpopulation mit über 90 % den deutlich größeren Anteil, wobei sie über ihre CD16-Expression<sup>89</sup> zudem das ausgeprägtere zytotoxische Potential im Vergleich zu den CD56<sup>high</sup> aufweisen. Ebenso besitzen sie Killerzell-Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren (Killer Ig-like receptor, KIR) auf ihrer Zelloberfläche<sup>88</sup>.

Die immunregulatorischen CD56<sup>high</sup> NK-Zellen zeichnen sich hingegen durch ihre große Bandbreite an sezernierten Zytokinen und Interleukinen aus, über die sie stimulierend bzw. hemmend auf weitere zelluläre Vertreter des Immunsystems Einfluss nehmen können. So setzen sie u. a. zur Rekrutierung und Aktivierung weiterer Immunzellen (T-Zellen, antigenpräsentierende dendritische Zellen, Phagozyten) den Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$ , Interferon (IFN)- $\gamma$  oder die Interleukine IL-10 und IL-13 frei<sup>90</sup>. Weitere zentrale Unterschiede bzgl. der phänotypischen und funktionellen Eigenschaften dieser beider NK-Zellsubpopulationen fasst Tab. 2 zusammen.

<b>Immunregulatorische CD56<sup>high</sup> [<math>\leq 10</math> %]</b>	<b>Zytotoxische CD56<sup>dim</sup> [<math>\geq 90</math> %]</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>CD16<sup>dim</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ wenige Perforin- und Granzym-Granula</li> <li>⇒ niedriges ADCC-Potential</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CD16<sup>bright</sup> <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ viele Perforin- und Granzym-Granula</li> <li>⇒ hohes ADCC-Potential</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>geringe / keine KIR-Expression</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>starke KIR-Expression</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>hohe IL2-Rezeptor-Expression <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ starke Proliferation unter IL-2</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>geringe IL2-Rezeptor-Expression <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ schwache Proliferation unter IL-2</li> </ul> </li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>wichtige immunregulatorische Rolle <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ starke Zytokinproduktion</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>geringe immunregulatorische Rolle <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ geringe Zytokinproduktion</li> </ul> </li> </ul>



▪ CD62L <sup>bright</sup> , CCR7 <sup>bright</sup> ⇒ Homing in lymphoide Organe	▪ CD62L <sup>-</sup> , CCR7 <sup>-</sup> ⇒ keine Homingfähigkeit
--	---

**Tab. 2 Funktionellen und phänotypischen Eigenschaften von NK-Zellsubpopulationen.** [erstellt nach <sup>84,88,90-92</sup>]

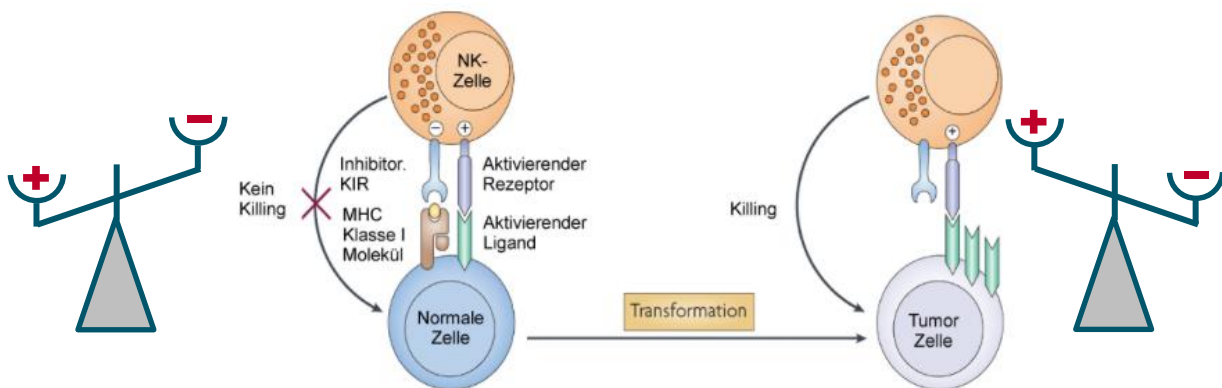
Neben dem Rezeptorenprofil regulieren v. a. aber auch Zytokine die komplexe Antwort der NK-Zellen. So führt beispielsweise die Behandlung mit IL-2 zu einer stärkeren zytotoxischen Reaktion der CD56<sup>high</sup> NK-Zellen, da diese konstitutiv den hochaffinen IL-2 Rezeptor exprimieren, während die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen den intermediär affinen IL-2 Rezeptor besitzen und daher weniger stark durch IL-2 aktiviert werden können<sup>92</sup>.

### „Selbst“-Toleranz von NK-Zellen

Zytotoxische NK-Zellen müssen, wie alle Effektorzellen des Immunsystems, zwischen gesunden körpereigenen Zellen auf der einen und entarteten, infizierten oder körperfremden Zellen auf der anderen Seite unterscheiden können. Die Grundlage dieser Fähigkeit wurde erstmals 1986 von K. Kärre und H. G. Ljunggren als sog. „**Missing-self-Hypothese**“ postuliert, nach der nur jene Körperzellen von NK-Zellen lysiert werden, die keine oder veränderte „selbst“ MHC (Major Histocompatibility Complex)-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Plasmamembran tragen<sup>93,94</sup>. Beim Menschen werden diese Oberflächenproteine auch HLA (Human Leukocyte Antigen)-Klasse-I genannt.

Die NK-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche korrespondierende inhibitorische Rezeptoren (v. a. KIRs und NKG2A<sup>+</sup>/CD94), die spezifisch gegen MHC-I gerichtet sind. Entsprechend sind gesunde, kernhaltige Körperzellen, die klassischerweise HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren, über die Aktivierung dieser hemmenden Rezeptoren vor einer NK-Zelleliminierung geschützt<sup>93,94</sup>.

Die HLA-Klasse-I Expression wird jedoch bei viele gestressten, viral infizierten oder entarteten Zellen herabreguliert oder verändert. Durch diesen Mechanismus entgehen diese pathogenen Zellen zwar der immunologischen Erkennung durch MHC-I-abhängige zytotoxische T-Zellen, sie werden aber andererseits derart erst für natürliche Killerzellen angreifbar.



**Abb. 11 „Missing-self“ Erkennung von Tumorzellen.** Der NK-Zellaktivierungszustand ergibt sich aus der dynamischen Balance aktivierender und inhibitorischer Zellrezeptoren. Entsprechend führt eine maligne Transformation einer Körperzelle z. B. zu einem Verlust der als hemmende Liganden wirkenden MHC-I Moleküle. Zudem werden i. R. des vermehrten zellulären Stress oder einer DNA-Schädigung vermehrt NK-zellaktivierende Liganden auf den Tumorzellen exprimiert. All dies führt letztlich zur Aktivierung der NK-Zellen und konsekutiv zur Induktion der Zielzelleliminierung. [modifiziert nach Ljunggren et al.<sup>95</sup> und Raulet et al.<sup>96</sup>]

Trotz der Eingängigkeit dieses Modells ist die Regulation der NK-Zellaktivierung in vivo deutlich komplexer (vgl. auch Abb. 11). Es scheint sich vielmehr um eine vielschichtig Signalbalance aus aktivierenden und hemmenden Signalen verschiedenster Rezeptoren zu handeln, die das Einleiten der Effektormechanismen steuern<sup>95,96</sup>.

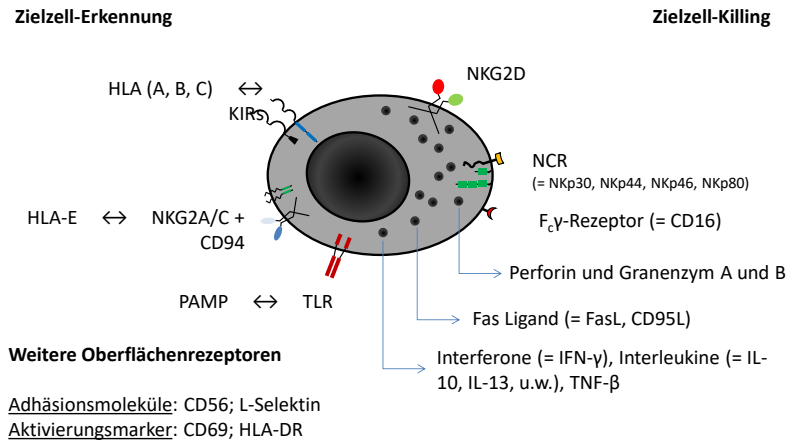
Arbeiten der letzten Jahre erweiterten diese Wirkhypothesen von Kärre und Ljunggren um das „(Non-) licensing“<sup>97</sup>, „Induced self“<sup>98</sup> und das „Hyporesponsiveness“ Modell<sup>96</sup>, das zunehmend auch die stimulierenden Rezeptoren in den Fokus nimmt. Ausgangspunkt dieser Modelle war die Beobachtung, das im menschlichen



Immunsystem auch NK-Zellen ohne inhibitorische Rezeptoren für körpereigene MHC zu finden sind und diese dann über nicht-inhibierende Rezeptoren gesteuert werden müssen<sup>97</sup>.

### NK-Zellrezeptoren

Die Rezeptoren der natürlichen Killerzellen, die gemäß der „missing-self“ Hypothese die Aktivität der NK-Zellen regulieren, lassen sich vornehmlich der Gruppe der Zielzell-Erkennungs- (Killerzell-Immunoglobulin-ähnliche Rezeptoren, C-Typ-Lektin-Rezeptoren; TLR) sowie der Zielzell-Tötungsrezeptoren (natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren, CD16) zu ordnen (vgl. auch Abb. 12).



**Abb. 12 NK-Zellrezeptoren.** Die Rezeptoren der natürlichen Killerzellen lassen sich funktionell in die Gruppe der Zielzell-Erkennungs- und die der Zielzell-Killingrezeptoren unterteilen. [Graphik erstellt nach <sup>86</sup>, <sup>98</sup> und <sup>99</sup>]

### NK-Rezeptoren zur Zielzell-Erkennung

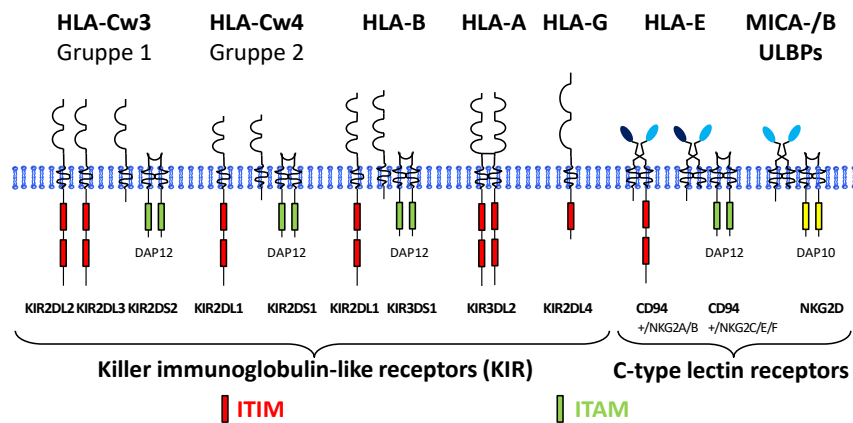
Zu den wohl wichtigsten Signalgebern zur Aktivierung und Regulation von NK-Zellen gehören **KIRs** (Killerzell-Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptoren / Killer Ig-like receptors). Ihre Nomenklatur orientiert sich hierbei an ihrem strukturellen Aufbau. Jeweils ein Transmembranglykoprotein verbindet die beiden (KIR2D) oder drei (KIR3D) Ig-ähnlichen extrazelluläre Domänen mit einer langen (long, L) oder kurzen (short, S) intrazellulären Domäne, deren Aufbau wiederum die funktionelle Untergliederung in eine aktivierende sowie eine inhibitorische Rezeptorensubklasse bedingt.

Beide KIR-Klassen erkennen ihre Zielzelle über die klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle (v. a. HLA-A, -B und -C<sub>1</sub> und 2)<sup>86,98,99</sup>. Hierbei wird die Bindungsaffinität zwischen KIR und HLA-I neben der Korrelation zwischen Rezeptor und Ligand, zudem vom HLA-Klasse-I-Molekül präsentierten Peptid beeinflusst.

Neben den KIRs dienen ebenso die **C-Typ-Lektin-Rezeptoren** über ihre charakteristische Kohlenhydrat-Erkennungsregion (CRD; carbohydrate recognition domain) der Zielzellerkennung. Strukturell setzen sie sich aus einer invarianten Untereinheit CD94 und einem funktionsdefinierenden, extrazellulären Heterodimer zusammen. Während CD94/NKG2-A und -B inhibitorisch wirken, besitzen die Gegenstücke CD94/NKG2-C, -E und -F eine aktivierende Funktion. An der Zielzelle erkennen diese Rezeptorkomplexe das nicht-klassische HLA-Klasse-Ib Molekül HLA-E<sup>100</sup>.

Eine Sonderstellung nimmt der rein aktivierende C-Typ-Lektin-Rezeptor NKG2D ein, der das Potential der Zielzelllyse, wie auch die Zytokinproduktion von NK-Zellen steigert<sup>101</sup>. Dieses heterodimerbildende Protein erkennt MHC-unabhängig seine Liganden, wie die stressinduzierten - bei viraler Infektion oder maligner Entartung - MHC-Klasse-I-assoziierten Moleküle MICA/B (MHC class I chain-related gene) oder ULBP1-6 (unique long 16-binding protein).

Eine untergeordnete Rolle in der Zielzellerkennung von NK-Zellen übernehmen die sog. Toll-like-Rezeptoren (**TLR**), die über die Erkennung erregersassoziierter molekularer Muster, sog. PAMPs (pathogen associated molecular patterns) insbesondere der Eliminierung bakterieller Erreger dienen.



**Abb. 13**  
Übersicht über die wichtigsten Vertreter der Killerzell-Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptoren und C-Typ-Lektin-Rezeptoren. Beide der beiden Rezeptoren-Klassen dienen der Zielzellerkennung.

Neben dem strukturellen Aufbau und funktionellen Eigenschaften der Rezeptoren, sind zudem die korrespondierenden Liganden vermerkt.

[Graphik erstellt nach <sup>86</sup>, <sup>98</sup> und <sup>99</sup>]

### NK-Rezeptoren zur Zielzell-Eliminierung

Ein Hauptmechanismus über den NK-Zellen entartete Tumorzellen eliminieren, erfolgt über die Aktivierung der sog. natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (**NCRs**, natural cytotoxicity receptors), wobei dieser Rezeptortyp bei humanen NK-Zellen konstitutiv als NKp46 (CD335), NKp80 und NKp30 (CD337) exprimiert wird. Zu einer vermehrten Expression von NKp44 (CD336) kommt es hingegen nur nach Stimulation der NK-Zellen beispielsweise durch IL-2. Ihre bereits in den 90er Jahren postulierte herausragende Bedeutung für die immunologische Tumorabwehr, konnte in vitro 2009 von Halftack et al. bestätigt werden. Seine Arbeitsgruppe konnte im Mausmodell zeigen, dass eine NCR-Deletion zur einer deutlichen Abnahme der NK-zellvermittelten Tumorzelllyse führt<sup>102</sup>.

Der **Fc $\gamma$ -RezeptorIII (CD16)** vermittelt über die Bindung opsonisierender IgG-Antikörper an den Zielzellen den NK-Zellmechanismus der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC). Weitere Details zu diesem Wirkmechanismus werden in Kapitel 1.3.2.2 erörtert.

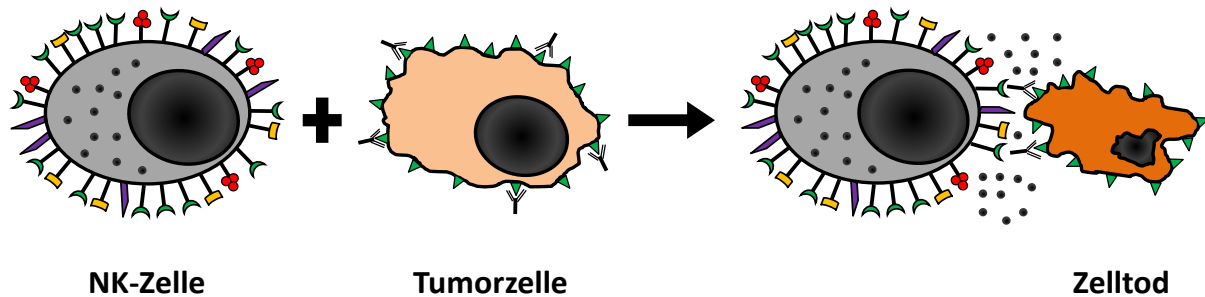
#### 1.3.2.2 Wirkmechanismen

Das Effektorpotenzial von natürlichen Killerzellen beruht in erster Linie auf zwei verschiedenen Wirkmechanismen, die sich sowohl auf der Ebene der Rezeptoren als auch auf der der intrazellulären Signaltransduktion unterscheiden. Neben der **natürlichen Zytotoxizität**, die v. a. über die in Kapitel 1.3.2.1 beschriebenen Rezeptorfamilie der natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (NCRs) vermittelt wird, bedienen sich NK-Zellen zur Zielzell-Eliminierung zudem der **antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität** (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC).

Unter letztem Mechanismus versteht man die Koppelung der unspezifischen Apoptoseinduktion der NK-Zellen mit der Spezifität von Antikörpern, die die Zielzelle opsonieren<sup>99</sup>. Hierbei erkennen die natürlichen Killerzellen die Tumorzellen über ihren Fc $\gamma$  III-Rezeptor (CD 16), der mit dem Fc-Teil der gebundenen IgG-Antikörpern interagiert<sup>84,89</sup>. Neben den NK-Zellen besitzen auch Granulozyten, Monozyten und Makrophagen die Fähigkeit zur ADCC. Das klinische Potential der antikörperabhängigen Zytotoxizität für die immunologische Tumorabwehr wurde in zahlreichen Studien unterstrichen und rückte mit dem zunehmenden Einzug der monoklonalen Antikörper in der onkologischen Therapie weiter in den Fokus der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit. Nicht zuletzt deshalb, da sich herauskristallisierte, dass die alleinige Modulation regulatorischer, pro-apoptotischer oder überlebensnotwendiger Signalkaskaden durch die Antikörper die Tumorzellen meist nur unzureichend bekämpft. Erst die Kombination dieser direkten mit den indirekten zellvermittelter Mechanismen (=ADCC) sichert den klinischen Erfolg von Antikörperbehandlungen.

Die letztliche Eliminierung der Tumorzellen basiert schließlich auf dem Perforin / Granenzym-Weg bzw. erfolgt über die Interaktion des Fas-Liganden mit seinem Rezeptor auf der Zielzelle. Bei ersterer Variante erfolgt die Induktion des programmierten Zelltodes mit der Exozytose von zytoplasmatischen Perforin- bzw. Granenzym-Vesikeln<sup>103</sup>. Hierbei perforiert das Zytotoxin Perforin die Plasmamembran der Targetzellen, woraufhin die

Serinproteasen Granzym A und B über diese geschaffenen Poren in die Zielzelle gelangen und dort Apoptose induzieren können.



**Abb. 14 NK-zellvermittelte ADCC gegen Tumorzellen.** Nach einer Opsonierung der Tumorzellen durch spezifische Antikörper können die NK-Zellen über ihren  $Fc\gamma$ -Rezeptor (RIIIa, CD16) die Tumorzellen über die Fc-Region der gebundenen Antikörper erkennen. Diese  $Fc$ - $Fc\gamma$ -Interaktion aktiviert die NK-Zellzytotoxizität und führt u. a. zur Freisetzung der lytischen Granula.  
[modifiziert nach Iannello et al.<sup>104</sup>]

Die Fas-rezeptorvermittelte Apoptoseinduktion spielt als weitere direkte Möglichkeit für die NK-Zellzytotoxizität eine eher untergeordnete Rolle<sup>105</sup>. Dieser Effektormechanismus ähnelt in weiten Teilen dem der zytotoxischen T-Zellen (= CTL) und beruht auf der Interaktion zwischen dem Fas-Liganden (= FasL, CD95L) der Effektorzellen mit dem Fas-Rezeptor (= FasR, CD95) auf der Oberfläche der Zielzellen. Der FasL kann dabei membrangebunden auf den NK- bzw. aktivierten CTL-Zellen auftreten oder in löslicher Form (sFasL = soluble Fas Ligand) vorkommen. Mit der Bindung von FasL an FasR werden nachgeschaltete Signalkaskaden (= Caspasen) aktiviert, die letztlich mit Induktion des natürlichen Zelltodes enden<sup>106</sup>.

### 1.3.2.3 Pathophysiologie der natürlichen Killerzellen und ihre klinische Bedeutung

Die natürlichen Killerzellen nehmen als Bindeglied innerhalb des humanen Immunsystems eine bedeutende Stellung in der Abwehr infektiologischer wie onkologischer Erkrankungen ein. Hierbei dient den NK-Zellen das aberrante MHC-I-Profil von virenbefallenen oder maligne entarteten Zellen, diese zu identifizieren.

Entsprechend konnten u. a. die beiden japanischen Arbeitsgruppen um S. Ishigami und M. Hyakudomi eine positive Korrelation zwischen dem Gehalt an intratumoralen NK-Zellen und einer besseren Prognose mit einem geringerem Ausmaß an Lymphknotenmetastasen für das Magenkarzinom belegen<sup>107,108</sup>. Vergleichbare Ergebnisse erbrachten klinische Studien an Patienten, die an einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom oder einem kolorektalen Karzinom erkrankten.

Zudem rücken NK-Zellen in der experimentellen Tumorthherapie zunehmend in den Fokus als effektive Immuntherapeutika. So wurden am Universitätsklinikum Lübeck i. R. eines therapeutischen Heilversuches Patienten, die an einem metastasierter Nierenzellkarzinome erkrankt waren, mit ex-vivo expandierten (Faktor  $10^6$ ) und mit Interleukin IL-2 und IL-15 stimulierten NK-Zellen therapiert. Unter dieser Behandlung konnte bei einigen Studienteilnehmern eine partielle Remission ihrer Lungenmetastasen beobachtet werden<sup>109</sup>.

Auch für Viruserkrankungen konnten verschiedene Arbeitsgruppe einen statistischen Zusammenhang zwischen dem Progress der HIV- oder HCV-Erkrankung und der absoluten NK-Zellkonzentration im Patientenblut nachweisen<sup>105,110</sup>. Andererseits kann eine Dysregulation der NK-Zellaktivität mit aufgehobener Hemmung der Autoimmunität über die Bekämpfung gesunder körpereigener Zellen zu Autoimmunerkrankungen führen. So beschrieb u. a. Morandi et al. eine Korrelationen zwischen der Zytokinproduktion von NK-Zellen und der Krankheitsprogression von Multipler Sklerose. Es scheint, dass eine vermehrte  $IFN-\gamma$  Ausschüttung eher zu einem erneuten Krankheitsschub mit neurotoxischer Wirkung führt, während vermehrte IL-5 Spiegel eher bei Remission gemessen werden können<sup>105,111</sup>. Ähnliche Zusammenhänge sind auch für den Lupus erythematodes, die Psoriasisarthritis sowie für die rheumatoide Arthritis beschrieben.

## 1.4 ZIELGERICHTETE TUMORTHERAPIE

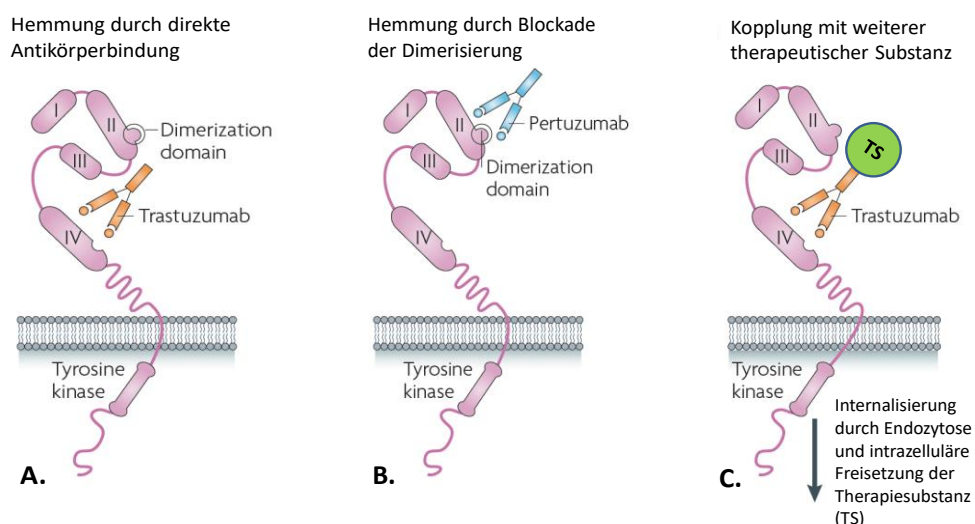
Im metastasierten Stadium des Mammakarzinoms stellt die medikamentöse Therapie den entscheidenden Behandlungspfeiler dar. Neben der klassischen Chemotherapie (z. B. mit Anthrazyklinen, Alkylanzien, Antimetaboliten, Taxanen und Alkaloiden) rückten die zielgerichteten Tumorthérapien in den vergangenen Jahren mehr und mehr ins Zentrum der Behandlung der Tumorpatientinnen. Dieser Target-spezifische Ansatz ist dabei gegen definierte Strukturen an bzw. in der Tumorzelle gerichtet und repräsentiert somit - zumindest in der Theorie - eine ideale Therapie, da sie ausschließlich den Tumor, normale gesunde Körperzellen jedoch nicht, bekämpft. Durch diese Selektivität - im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie - ergeben sich für die Patientinnen deutlich reduzierte Nebenwirkungsprofile. Das heutige Spektrum zielgerichteter Tumorthérapeutika bei Mammakarzinom wächst beständig. Zu den seit Jahrzehnten bekannten antihormonellen Therapien, kamen in den letzten Jahren v. a. Tyrosinkinaseinhibitoren und monoklonale Antikörper.

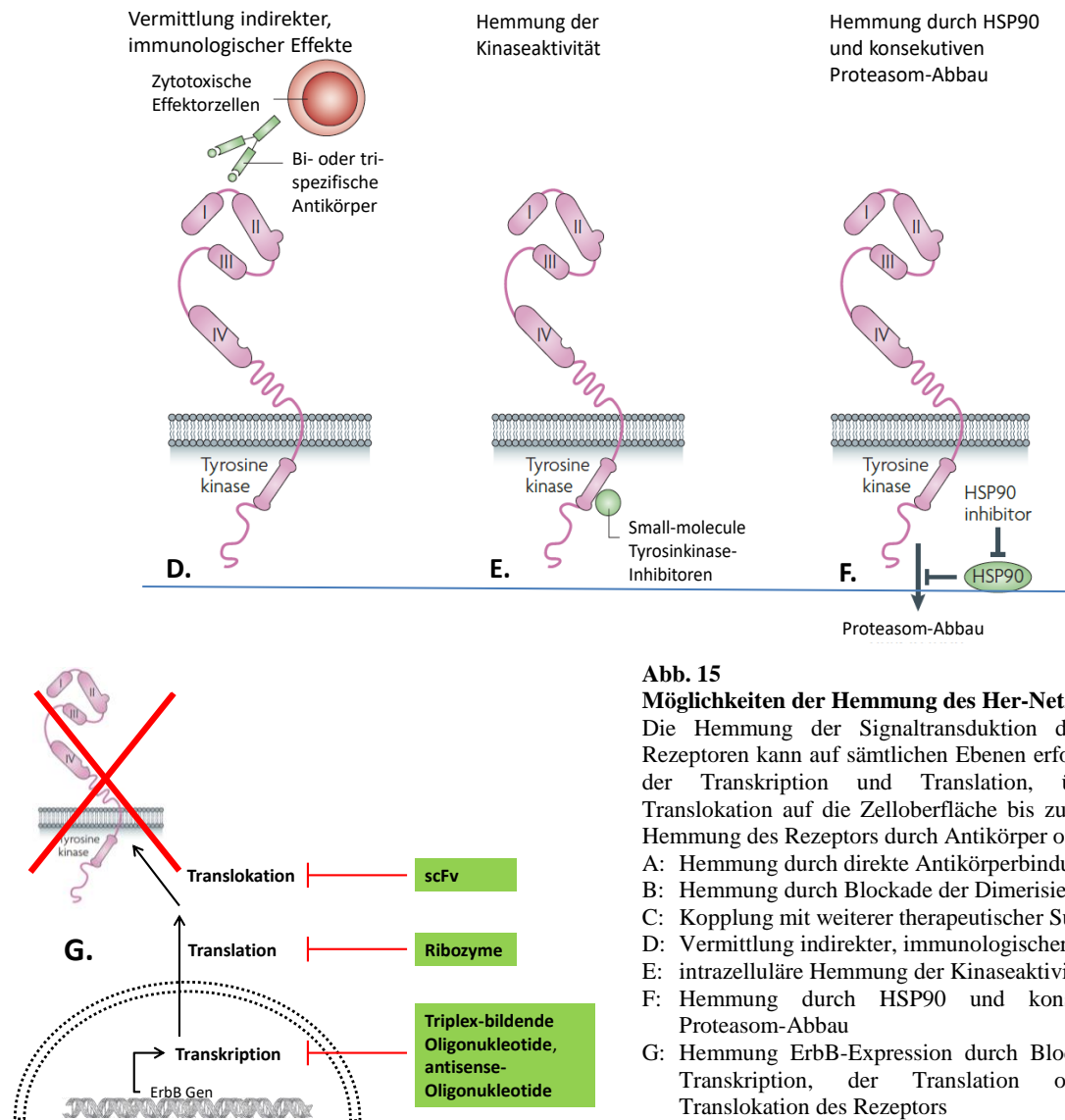
### Der ErbB-Rezeptor als Angriffspunkt für Target-spezifische Therapien

Nicht zuletzt da die ErbB-Rezeptoren eine zentrale Stellung in der malignen Entartung des Mammakarzinoms einnehmen und bei vielen Patientinnen aufgrund einer Genamplifikation konstitutiv proliferativ aktiv sind, stehen sie zunehmend im Fokus einer spezifischen medikamentösen Therapie des Brustkrebses.

Die bisher bekannten Strategien zur Einflussnahme auf die Her-Signaltransduktion reichen von der Störung der initialen Ligandenbindung, bis zur Hemmung der letztendlich resultierenden Translation des modulierten Zielgens und umfassen u. a. die in Abb. 15 dargestellten Möglichkeiten:

1. **Therapeutische Antikörper**, wie Trastuzumab (Herceptin®) [A], Pertuzumab (Perjeta®) [B] oder mAb1479, die eine Bindung des Liganden oder eine Rezeptordimerisierung unterbinden. Des Weiteren wurden gekoppelte Antikörper entwickelt, die eine lokalisierte Wirkung der transportierten Therapieerika ermöglichen [C]. Ein weiterer Mechanismus der Antikörper liegt in der Vermittlung des zytotoxischen Potentials von Effektorzellen [D].
2. **Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKIs)**, wie Lapatinib (Tyverb®) [E] oder die Pankinase-Inhibitoren Sorafenib (Nexavar®) und Neratinib, die eine Bindung von ATP an die Kinasedomäne verhindern.
3. **Hsp90-Inhibitoren**, die zu einer Destabilisierung und Abbau des Her2-Rezeptors führen [F].
4. **Triplex-bildende Oligonukleotide, antisense-Oligonukleotide oder Ribozyme**, zur Hemmung der Transkription bzw. Translation [G].
5. **Einzelsträngige Fv-Fragmente von Antikörpern (scFv)**, zur Hemmung der Translokation der Rezeptoren an die Zelloberfläche [G].



**Abb. 15****Möglichkeiten der Hemmung des Her-Netzwerkes.**

Die Hemmung der Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren kann auf sämtlichen Ebenen erfolgen: von der Transkription und Translation, über die Translokation auf die Zelloberfläche bis zur direkten Hemmung des Rezeptors durch Antikörper oder TKIs.

A: Hemmung durch direkte Antikörperbindung

B: Hemmung durch Blockade der Dimerisierung

C: Kopplung mit weiterer therapeutischer Substanz

D: Vermittlung indirekter, immunologischer Effekte

E: intrazelluläre Hemmung der Kinaseaktivität

F: Hemmung durch HSP90 und konsekutivem Proteasom-Abbau

G: Hemmung ErbB-Expression durch Blockade der Transkription, der Translation oder der Translokation des Rezeptors

[modifiziert nach Yarden et al.<sup>11</sup> und Baselga et al.<sup>112</sup>]

Trotz der großen onkologischen Forschungsbemühungen und der durchschlagenden klinischen Erfolge der Target-spezifischen Tumorbehandlung, wird diese durch die zunehmende Resistenzentwicklung limitiert<sup>113</sup>.

### 1.4.1 Monoklonale, therapeutische Antikörper

#### 1.4.1.1 Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin) wurde als erster therapeutischer Antikörper für die Behandlung des metastasierten Mammakarzinoms von den Pharmafirmen Roche und Genentech entwickelt. Die klinische Zulassung erfolgte 1998 in den USA und im Jahre 2000 in der Europäischen Union.

#### Wirkungsweise, Indikation und Nebenwirkungen

Dieser monoklonale humanisierte Antikörper ist gegen die extrazelluläre Domäne IV des ErbB2-Rezeptors (vgl. 1.2.2) gerichtet und wirkt über zahlreiche Mechanismen hemmend auf die Proliferation von Tumorzellen sowie pro-apoptotisch<sup>114,115</sup>. Zellphysiologisch wurden in zahlreichen in vitro Untersuchungen gezeigt, dass dies u. a. auf eine Hemmung des pro-proliferativen Ras-MAPK-Signalwegs, eine Downregulation von ErbB2, z. T. über eine verstärkte Internalisierung des Rezeptors, sowie eine Hemmung der ErbB-Rezeptor-Heterodimerisierung zurückzuführen ist.

Die Bindung von Trastuzumab blockiert die enzymatische Abspaltung der extrazellulären Her2-Domäne (ECD) und verhindert hierdurch die Entstehung eines konstitutiv aktiven, membranständigen ErbB2-Fragmentes (= p95Her2)<sup>43</sup>. Pharmakologisch begründet sich diese gehemmte Rezeptorproteolyse darin, dass Trastuzumab strukturell das Angriffsepitop beispielsweise der Metalloproteinase ADAM10, die eine wichtige Funktion bei dieser Abspaltung übernimmt, blockiert. Zudem wurde in verschiedenen klinischen Studien gezeigt, dass eine Reduktion des im Serum zirkulierenden Her2-ECD-Levels als Surrogatmarker für das positive Ansprechen für eine Herceptin-Therapie verwendet werden kann und mit einem längeren progressionsfreien Überleben korreliert<sup>116</sup>.

Zudem induziert Trastuzumab in Tumorzellen mit einer Her2-Überexpression über eine gesteigerte Expression antiproliferativer Moleküle wie dem CDK-Inhibitor p27<sup>kip1</sup> (cyclin-dependent kinase inhibitor p27) einen G1-Arrest<sup>114</sup>. Auch wird Trastuzumab über eine PTEN-vermittelte Hemmung des PI3K/Akt-Signalwegs eine proapoptotische Komponente zugerechnet<sup>117</sup>. Ein weiterer antitumorgener Effekt von Trastuzumab beruht auf der Synthesehemmung von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- $\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ ) und Ang-1 (Angiopoietin-1) sowie der Aktivierung des antiangiogenen Faktors Thrombospondin-1 und der damit verbundenen Mindervaskularisierung der Tumorzellen.

Besonders interessant für die Kombinationstherapien aus Herceptin und klassischen Chemotherapeutika ist, dass Trastuzumab über eine Hemmung von zellulären Reparaturmechanismen die Tumorzellen chemosensibilisiert<sup>118</sup>.

Den direkten Wirkungsmechanismen stehen indirekte, immunsystemvermittelte gegenüber. So bedingt Trastuzumab u. a. die antikörpervermittelten Zytotoxizität (ADCC) von natürlichen Killerzellen und anderen myeloiden Immunzellen sowie eine Komplementaktivierung (complement-dependent cytotoxicity, CDC). Letztlich resultiert dies in einer Lyse von Tumorzellen<sup>119</sup>. Zusätzlich kann eine Antikörpertherapie zu einer vermehrten Immunzellinfiltration führen, wie dies in mehreren Xenograft-Modellen gezeigt wurde.

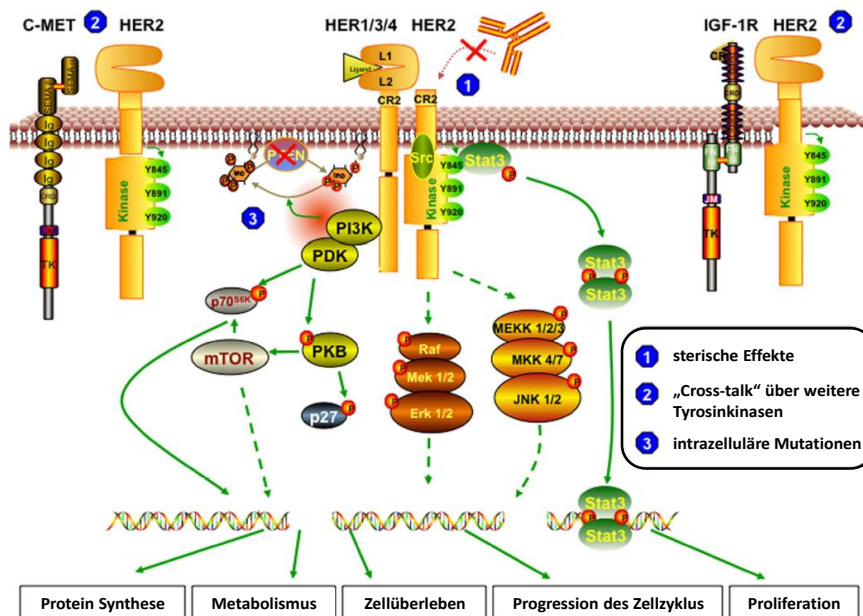
Neben der ursprünglichen Zulassung lediglich für das metastasierte Stadium, erfolgte im Mai 2006 nach der Veröffentlichung mehrerer wegweisender Phase III Studien (u. a. NSABP B-31<sup>120</sup>, NCCTG 9831<sup>120</sup> und BCIRG 006<sup>121</sup>), eine erweiterte Zulassung für die adjuvanten Therapie des operablen, nicht metastasierten, ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinoms. Auch in der Meta-Analyse dieser unabhängigen Studien konnte eine signifikante Verlängerung u. a. des Rezidivfreien- sowie des Gesamt-Überlebens durch eine Trastuzumab-Nachbehandlung gezeigt werden<sup>122</sup>.

Vor dem Hintergrund des molekularen Angriffsortes von Trastuzumab erklärt sich, dass in erster Linie Patientinnen mit einem Her2-überexprimierenden Tumor von einer Behandlung mit diesem therapeutischen Antikörper profitieren. Klassischerweise erfolgt der Nachweis in der klinischen Routine über eine semiquantitative immunhistochemische Analyse des Tumorsektats, obgleich die aufwendigere und teurere Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) als Goldstandard direkt die ursächliche Amplifikation des ErbB2-Gens nachweist. In der aktuellen Leitlinie zur Therapie des Mammakarzinoms wird daher der Einsatz von Trastuzumab für operable und metastasierte Her2-positive Tumore (3+ oder FISH positiv) in Kombination oder adjuvant an eine klassische Chemotherapie zusammengefasst<sup>123</sup>.

Trastuzumab gilt aufgrund seines spezifischen Angriffsortes als relativ gutverträgliches Medikament ohne gravierendes Nebenwirkungsprofil. Außer einer gelegentlichen Hypersensitivitätsreaktion i. R. der ersten Medikationsgabe, ist nur die potentielle Kardiotoxizität eine weitreichende unerwünschte Wirkung. Insbesondere in Kombination mit den synergistisch kardiotoxischen Anthrazyklinen treten in bis zu 4,1 % der Fälle Herzinsuffizienzen im Stadium NYHA III/IV auf<sup>120,124</sup>. Zu kardialen Ereignissen geringerer Ausprägung kommt es jedoch bei bis zu einem Drittel der Patienten<sup>125</sup>. Entsprechend bezifferte die Arbeitsgruppe um Cardinale et al. den Anteil von Patientinnen in einer Trastuzumab-Therapiegruppe mit einem signifikanten Troponin I Anstieg, also einem Surrogatparameter einer Herzmuskelschädigung auf 16,7 %<sup>126</sup>. Auf molekularbiologischer Ebene lässt sich der unerwünschte Effekt auf die zentrale Stellung der ErbB-Rezeptoren in der Homöostase von Kardiomyozyten zurückführen.



## Resistenzentwicklung



**Abb. 16**  
Übersicht über die zellulären Resistenzmechanismen gegenüber Trastuzumab.

- 1.) Sterische Effekte oder Epitopmaskierung der Trastuzumab-Bindungsstelle.
  - 2.) „Cross-talk“-Resistenz über eine vermehrte Expression anderer Tyrosinkinase-Rezeptoren, wie dem c-Met- oder dem IGF-1-Rezeptor sowie mittels Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie.
  - 3.) Intrazelluläre Mutationen in nachgeschalteten Her2-Signalkaskaden.
- [modifiziert nach Vu et al.<sup>127</sup>]

Trotz der hervorragenden Zulassungsdaten, erleidet die Mehrzahl der Patientinnen mit einem metastasierendem Mammakarzinom, die initial gut auf eine Trastuzumab-Therapie angesprochen haben, innerhalb eines Jahres eine Tumorrogressions<sup>121,128</sup>. Zu dieser erworbenen Resistenz addieren sich über Zweidrittel (66 - 88 %) der Brustkrebspatientinnen, die trotz einer ErbB2-Überexpression, intrinsisch bzw. de novo nicht auf diesen therapeutischen Antikörper ansprechen<sup>116,121,127</sup>.

Trotz zahlreicher in vitro und in vivo Studien konnte die Ursache dieser Resistenzen noch nicht abschließend geklärt werden. U. a. folgende Erklärungsmodelle, die sich letztlich in drei Mechanismusgruppen untergliedern lassen, werden derzeit diskutiert<sup>115,127</sup>:

### 1. Sterische Effekte oder Epitopmaskierung der Trastuzumab-Bindungsstelle

Ein möglicher Ansatz für die fehlende Trastuzumab-Rezeptorbindung ist der proteolytische Verlust der extrazellulären Her2-Domäne<sup>43</sup>. Das entstandene Rezeptorfragment, p95Her2, weist zusätzlich eine konstitutiv aktive Tyrosinkinase auf.

Klassischerweise erfolgt die sterische Hemmung der Antikörperbindung jedoch über eine Coexpressionen von membranständigen Molekülen wie MUC-4 (Mucin-4). Eine vermehrte Expression dieses großen Glykoproteins wird beispielsweise mit der Trastuzumab-Resistenz der Her2-genamplifizierten Brustkrebszelllinie JIMT-1 in Verbindung gebracht<sup>129</sup>. Auch konnten verschiedene Arbeitsgruppen in klinischen Studien eine positive Korrelation zwischen dem Mucin-4-Niveau und einer schlechten Patientenprognose - nicht nur für das Mammakarzinom - nachweisen<sup>129,130</sup>.

### 2. „Cross-talk“-Resistenz über vermehrte Expression anderer Tyrosinkinase-Rezeptoren

Die Mitglieder der ErbB-Familie bilden untereinander sich gegenseitig aktivierende Dimere, womit ein komplexes Signalnetz entsteht. Vor diesem Hintergrund erscheint es möglich, dass derart die hemmenden Effekte einer Trastuzumab-Therapie kompensiert werden können<sup>26</sup>. So zeigten u. a. die Arbeitsgruppen um G. Brockhoff<sup>131</sup> und X. Chen<sup>132</sup>, dass eine vermehrte Expression von EGFR und ErbB3 die Wirkung eines ErbB2-Targeting deutlich reduziert.

Dies gelingt auch über die alternative Interaktion mit anderen Rezeptortyrosinkinasen wie dem IGF-1- (Insulin-like Growth Factor-I) oder dem c-MET-Rezeptor. Die jedoch zugrundeliegenden Mechanismen, wie diese Rezeptorinteraktion zu einem Herceptin-Resistenz führt, bleiben letzten Endes noch unklar.

Der Mechanismus der „Cross-talk“-Resistenz wurde ebenfalls für das Zusammenwirken von Her2 und dem Estrogenrezeptor beschrieben. Nicht nur, dass eine ErbB2-Überexpression zu einer Östrogen-unabhängigen Proliferation von Tumorzellen führen kann, was wiederum eine Resistenz gegenüber einer anti-hormonellen Therapie bedingen kann<sup>133</sup>. Ebenso wurde gezeigt, dass sich Mammakarzinomzellen durch eine vermehrte ER-Expression einer anti-Her2 Therapie entziehen können<sup>134</sup>.

### 3. Intrazelluläre Mutationen in nachgeschalteten Her2-Signalkaskaden

Die dritte Mechanismusgruppe der Resistenzentwicklung fußt auf einer (partiellen) Entkoppelung des proliferativen Signalings von den membranständigen Her-Rezeptoren. Ursächlich für die resultierende, konstitutive Aktivierung v. a. des PI3K/Akt-Weges ist entweder eine hyperaktivierende PIK3CA Mutation<sup>135</sup> oder aber ein Verlust des PTEN-Proteins. Dieser Tumorsuppressor führt in gesunden Zellen zur Dephosphorylierung von PIP3 und somit zur Blockade des AKT-Weges. Die klinische Relevanz dieses Mechanismus wurde u. a. von Nagata et al. herausgearbeitet. Er konnte bei über einem Drittel (36 %) der Brustkrebspatientinnen im Stadium IV diesen PTEN-Verlust nachweisen<sup>117</sup>. Die Arbeitsgruppen um K. Berns und Y. Kataoka beschrieben ein deutlich schlechteres Outcome mit verkürztem Progressionsfreiem Überleben bei diesen Patientinnen<sup>135,136</sup>.

Ergänzend scheint eine Überaktivierung der Tyrosinkinase c-SRC mit der Entwicklung einer de novo sowie einer erworbenen Trastuzumab-Resistenz assoziiert zu sein. Nach der klinischen Beobachtung, dass Patienten mit einem aktiven Src signifikant schlechter auf eine Herceptin-Behandlung ansprechen, wurde diesem Enzym von S. Zhang eine Schlüsselrolle in der Entwicklung einer Trastuzumab-Resistenz zugeschrieben. Andererseits bietet dies die Chance, über einen gezielten pharmakologischen Angriff gegen c-SRC, die Trastuzumab-Resistenz zu überwinden<sup>137</sup>.

#### 1.4.1.2 Pertuzumab

Als Antwort auf das relativ häufige Therapieversagen einer Trastuzumab-Therapie wurden weitere therapeutische Antikörper für den klinischen Einsatz entwickelt. Der monoklonale anti-Her2-Antikörper **Pertuzumab (2C4, Perjeta)**, der seit 2013 in Deutschland klinisch eingesetzt wird, bildet hierbei sicherlich den Hauptvertreter. Dieser auch zur Behandlung von Brustkrebspatientinnen mit nur moderater Her2-Expression zugelassene Antikörper ist gegen die Domäne II des ErbB2-Rezeptors gerichtet, also jene extrazelluläre Struktur, die der Ausbildung der Dimerisierungsschleife mit weiteren ErbB-Rezeptoren dient<sup>138</sup>. Somit führt eine Pertuzumab-Behandlung zu einer sterischen Hemmung der Heterodimerisierung von Her2 mit anderen Vertretern der ErbB-Familie<sup>138</sup>, was letztlich in einer fehlenden Aktivierung der nachfolgenden proliferativen oder anti-apoptotischen Signalkaskaden, wie MAP-Kinasen oder PI3K, resultiert<sup>139</sup>. Außerdem besitzt auch Pertuzumab indirekte immunsystemvermittelte Wirkmechanismen.

#### Klinische Zulassung, Indikation und Nebenwirkungsprofil

Aufgrund der synergistischen Wirkung von Trastuzumab und Pertuzumab erstreckt sich die primäre Indikation von Perjeta auf eine Kombinationsanwendung der beiden anti-Her2-Antikörper gemeinsam mit Docetaxel bei chemonaiven Patienten mit metastasiertem oder lokal rezidivierenden, inoperablem Mammakarzinom sowie auf die neoadjuvanten Behandlung bei hohem Rezidivrisiko<sup>140–142</sup>.

Diese Zulassung erfolgt vor dem Hintergrund der Ergebnisse folgender drei wegweisender Studien:

##### **NeoSphere<sup>140</sup>**

Die von Gianni et al. koordinierte Phase-II-Studie NeoSphere an 417 Patientinnen untersuchte die Wirksamkeit und Sicherheit einer zusätzlichen Pertuzumab-Gabe in der Neoadjuvanz beim lokal fortgeschrittenen, inflammatorischen oder frühen Her2-positiven Mammakarzinom. Hier zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe, die nur mit Trastuzumab plus Docetaxel behandelt wurde, eine signifikant höhere Rate der pathologischen Komplettremissionen.



**TRYPHAENA<sup>143</sup>**

Die 2013 veröffentlichte TRYPHAENA-Studie (n = 225) verfolgte ebenfalls einen neoadjuvanten Ansatz, legte jedoch einen Schwerpunkt auf die kardiale Verträglichkeit einer Perjeta-Behandlung. Im Ergebnis beschrieben Schneeweiss et al. bei einem vergleichbaren onkologischen Outcome ein signifikant niedrigeres Ausmaß an klinisch relevanten Herzinsuffizienzen in der zusätzlich Pertuzumab-behandelten Patientengruppe.

**CLEOPATRA<sup>144</sup>**

Die CLEOPATRA-Studie untersuchte die Wirksamkeit von Perjeta in Kombination mit Trastuzumab und Docetaxel beim fortgeschrittenen ErbB2-überexprimierenden Mammakarzinom im Vergleich zu einer Kombinationstherapie aus Herceptin und Docetaxel. Die Ergebnisse dieser Phase III Studie an 808 Patientinnen zeigen eine statistisch signifikante und klinisch relevante Verlängerung des progressionsfreien Überlebens (18.5 M. vs. 12.4 M.;  $P < 0.001$ ) sowie des Gesamtüberlebens bei einem vergleichbaren und gutem Sicherheitsprofil. Zu den häufigsten Nebenwirkungen ( $\geq 50\%$ ) dieser Dreifach-Therapie gehörten Diarrhö, Alopezie und Neutropenie. Als unerwünschte Wirkung 3 - 4. Grade gemäß NCI-CTCAE traten mit über 10 % febrile Neutropenie und Leukopenie auf. Die gefürchteten kardialen Nebenwirkungen waren in der Therapiegruppe sogar niedriger im Vergleich zum Kontrollkollektiv (8.3 % vs. 4.4 %).

**1.4.1.3 mAb1479**

Mit dem monoklonalen Antikörper mAb1479, der gegen die extrazelluläre Domäne der JMa Isoform von Her4 gerichtet ist, befindet sich ein weiterer therapeutischer Antikörper in der präklinischen Evaluation und dient in der vorliegenden Arbeit als Target-spezifisches Medikament mit deutlich anderem Angriffspunkt.

Maija Hollmén et al. konnte zeigen, dass die Zugabe von Ab1479 zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation der beiden maligne entarteten Mammazelllinien T47D und MCF7 führt. Funktionell führte sie es - in in vitro Studien - u. a. auf eine verminderte Her4-Expression im Sinne einer vermehrten Downregulation bzw. einer gesteigerten Ubiquitinierung des Rezeptors zurück. Des Weiteren scheint Ab1479 das Her4-induzierte Signaling durch Blockierung der ligandenvermittelten Rezeptorphosphorylierung der Isoform JMa sowie sein Ektodomain-Shedding zu unterdrücken<sup>50,145</sup>.

**1.4.2 Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib**

Die Wirkungsweise des 2001 von D. W. Rusnak erstmals charakterisierten dualen und reversiblen Tyrosinkinaseinhibitors **Lapatinib** (GW 572016, Tyverb<sup>®</sup>) ist auf eine spezifische, intrazelluläre Hemmung von EGFR und ErbB2 zurückzuführen. Pharmakologisch beruht der Effekt auf einer kompetitiven Hemmung des small Molecule mit ATP um die ATP-Bindungsstellen der beiden Rezeptoren<sup>146,147</sup>. Eine Lapatinibbehandlung resultiert daher auf zellulärer Ebene, trotz extrazellulärer Ligandenbindung, in einer unterbundenen Autophosphorylierung und in der Hemmung der nachgeschalteten Signalkaskaden. In mehreren in vitro Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass die starke Proliferationshemmung und der vermehrte Tumorzelltod v. a. auf die Inhibition der Signaltransduktion via Ras-/MAPK und AKT zurückzuführen ist und dieses Ausmaß mit der Her2-Expression korreliert<sup>146,148</sup>. Lapatinib besitzt antiangiogene Eigenschaften, da die Vaskulogenese von VEGF ebenfalls über den Lapatinib-blockierbaren VEGF-Tyrosinkinase-Rezeptor vermittelt wird.

Die deutlich geringere Substanzgröße von Lapatinib im Vergleich zu den therapeutischen Antikörpern ermöglicht eine Passage über die Blut-Hirn-Schranke<sup>149</sup>. Vor diesem Hintergrund qualifiziert sich Lapatinib als Hoffnungsträger in Bezug auf die Therapie und Prävention von ZNS Metastasen. In ersten vielversprechenden Studien wurde bereits, aufgrund der Liquorgängigkeit, eine deutlich niedrigere Inzidenz von ZNS-Metastasen durch den Einsatz von Tyverb beschrieben<sup>150</sup>.

Lapatinib ist seit Ende 2008 in Kombination mit dem oralen Antimetaboliten Capecitabin für die Therapie bei Patientinnen mit einem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Her2-positiven Mammakarzinom

zugelassen, die bereits mit Chemotherapie und Trastuzumab vorbehandelt wurden<sup>123,147,150</sup>. Die zugrundeliegende Zulassungsstudie konnten hierbei eine signifikante Verlängerung der TTP (= Time To Progression) dieses Zweitlinienschemas belegen<sup>123</sup>. Eine weitere Zulassung erhielt Lapatinib 2010 für die First-Line Therapie postmenopausaler Patientinnen mit Hormonrezeptor- und ErbB2-positivem metastasierendem Mammakarzinom, die derzeit nicht für eine Chemotherapie vorgesehen sind<sup>123,147</sup>. Pathophysiologisch ist dieser Einsatz a. e. auf den modulierenden Effekt von Lapatinib auf den Östrogenrezeptors zurückzuführen, der in vitro resistente Zellen erneut einer endokrinen Therapie zugänglich macht<sup>151</sup>.

Auch die fehlende Kardiotoxizität von Lapatinib in Gegensatz zur Kombinationstherapie von Trastuzumab mit Anthrazyklinen eröffnet Einsatzoptionen für diesen Tyrosinkinaseinhibitor<sup>120,124</sup>. Vor diesem Hintergrund stellt somit der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib eine weitere hoffnungsvolle Säule v. a. in der Therapie von Patientinnen mit einem trastuzumabresistenten, Her2-positiven Mammakarzinom dar.

### 1.4.3 Antihormonelle Therapie

Die antihormonelle Therapie repräsentiert beim Mammakarzinom eine integrale und höchst wirksame Therapiesäule in der adjuvanten, z. T. auch in der neoadjuvanten Versorgung sowie in der palliativen Situation von Östrogenrezeptor positiven Tumoren. Sie zeichnet sich durch ihre geringe Toxizität, dem niedrigen therapeutischen Versorgungsaufwand - meist in Form einer oralen Therapie - und einem tolerablen Nebenwirkungsprofil aus<sup>152</sup>.

Die pharmakologische Grundlage hierzu findet sich in der Antagonisierung des pro-proliferativen Effektes von Östrogenen auf Brustkrebszellen. Neben der direkten Hemmung der Estrogenproduktion mittels Ovariectomie oder durch Gabe von LHRH-Agonisten (prämenopausal) bzw. Aromataseinhibitoren (postmenopausal), gelingt dies auch indirekt über eine Blockade des Estrogenrezeptors. Im klinischen Einsatz hierzu kommen v. a. die beiden Wirkstoffklassen der selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) wie Tamoxifen und die selektiven Estrogenrezeptor-Downregulatoren (SERDs) wie Fulvestrant zur Anwendung.

Aufgrund seines Einsatzes im experimentellen Abschnitt der vorliegenden Dissertation wird im Folgenden näher auf Tamoxifen als Hautvertreter der SERM eingegangen.

#### 1.4.3.1 Tamoxifen

Der selektive Estrogenrezeptormodulator (SERM) Tamoxifen, der 1962 von D. Richardson erstmals synthetisiert und bereits in den 70er Jahren als erstes „Antiöstrogen“ zugelassen wurde<sup>152</sup>, bindet als nichtsteroidales Triphenylethylen aufgrund seiner Tertiärstruktur an beide Isoformen des ERs. Während Östradiol beide transaktivierende Domäne (AF1 und AF2) des ERs aktiviert, vermag dies Tamoxifen lediglich an der AF-1 Domäne. AF-2 wird hingegen deaktiviert. Entsprechend besitzt Tamoxifen gewebespezifisch sowohl antagonistisch (= antiöstrogene) als auch agonistische (= östrogene) Effekte<sup>153</sup>.

In seiner antagonistischen Form verdrängt Tamoxifen somit Östradiol kompetitiv vom Östrogenrezeptor und führt so zur Rekrutierung von Ko-Repressoren, welche die Aktivität des Rezeptors hemmen. Auf diese Weise wirkt Tamoxifen durch einen Zellzyklusarrest in der G0/G1 Phase v. a. proliferationshemmend auf Tumorzellen<sup>153</sup>. SERMs können über die Einflussnahme auf die Homöostase verschiedener Mediatoren in einem geringen Ausmaß auch Apoptose induzieren.

Zellbiologisch ist das duale und gewebeanhängige Wirkprofil der SERMs zum einen mit dem unterschiedlichen Expressionsprofil der ER-Isoformen und damit mit der Variabilität der ER-Homo- bzw. Heterodimere in den verschiedenen Zellarten wie auch mit dem unterschiedlichen Verhältnis von AF-1 zu AF-2 zu erklären. So wirkt Tamoxifen in AF1-dominierende Zellen, wie in ossären, endometrialen oder kardiovaskulären Gewebe, eher agonistisch-östrogen<sup>154</sup>.

Zum anderen finden sich gewebeabhängig variable Spiegel der Co-Regulatoren des ERs. Während beispielsweise in Brustkrebszellen eher ein Überschuss an Ko-Repressoren vorliegt, finden sich in

Endometriumzellen vor allem Co-Aktivatoren. In diesem Zusammenhang lässt sich entsprechend die hemmende Wirkung von Tamoxifen auf den mammiliären Estrogenrezeptor erklären, während es andererseits eher zu einer endometrialen Hyperplasie, aufgrund der erhöhten ER-Aktivität kommt<sup>154</sup>.

Zusammenfassend spiegelt sich diese antagonistische Wirkung der SERMs in ihren Nebenwirkungsprofilen wieder. Über die agonistischen Effekte am ossären ER reduziert eine Tamoxifentherapie das Osteoporoserisiko und senkt die postmenopausale Frakturrate, zum anderen erhöht sie das Risiko für Endometriumkarzinome und thromboembolische Ereignisse<sup>155</sup>.

### **Resistenzentwicklung**

Das gefürchtete Szenario einer primären oder einer sekundären Resistenz gegenüber Tamoxifen wird während einer antihormonellen Therapie des Mammakarzinoms in einer ähnlichen Art und Weise wie bei der Target-spezifischen Therapie mit monoklonalen Antikörpern (vgl. 1.4.1) beobachtet.

Eine de novo Resistenz zeigt sich bei ca. 40 % aller Patientinnen mit einem ER $\alpha$ -positiven Mammakarzinom, wobei bei den Meisten Polymorphismen in den Tamoxifen-metabolisierenden Enzymen zugrunde liegen<sup>156</sup>.

Die erworbene Tamoxifen-Resistenz scheint hingegen mit der komplexen Regulation und vielfältigen Kopplung des Östrogenrezeptors mit weiteren zellulärer Signalwege assoziiert. Diese multiplen Ansatzpunkte ermöglichen Mammakarzinomzellen eine sekundäre Entkopplung von ihrer Östrogenabhängigkeit und führen bei annähernd allen Mammakarzinompatientinnen im metastasierten Stadium und bei ca. 50 % (40 - 60 %) aller Frauen ohne Fernmetastasen zu einem Rezidiv und Progress während der antihormonellen Behandlung<sup>157</sup>.

U. a. wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen folgende Resistenzentwicklungsmechanismen beschrieben:

- Änderungen in den Konzentrationen von Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren des ERs<sup>158</sup>.
- Verringerung oder Verlust der ER $\alpha$ -Expression unter endokriner Therapie<sup>159</sup>.
- Mutationen des ER $\alpha$ -Gens mit Expression von ER $\alpha$ -Isoformen<sup>160</sup>.
- Überexpression des membranständigen Östrogenrezeptors GPR30<sup>161</sup>.  
Tamoxifen wirkt rein agonistisch am GPR30 und besitzt somit einen pro-proliferativen Effekt auf Mammakarzinomzellen, da neben der Aktivierung des MAPK- und des PI3K-Signalweges auch indirekt zahlreiche Transkriptionsfaktoren stimuliert werden.
- Crosstalk zwischen dem Östrogenrezeptor und weiteren Signalwegen, insbesondere zu denen der ErbB-Rezeptoren.

Eine Überexpression bzw. Überaktivität von EGFR oder Her2 führt über eine Hochregulierung von MAPK- und PI3K/AKT-aktivierenden Signalwegen zu einer vermehrte Phosphorylierung des ER $\alpha$  bzw. dessen Ko-Aktivatoren (z. B. AIB1). Diese indirekte ER-Aktivierung bedingt die konsekutive Tamoxifen-Resistenz. Vor diesem Hintergrund wurde eine Her2-Amplifikation bzw. Her2-Überexpression als unabhängiger, klinischer Prognoseparameter für eine Tamoxifen-Resistenz bei ER-positiven Kollektiven etabliert<sup>157</sup>.

## 2 ZIELSETZUNG

Der epidermale Wachstumsfaktor Her2 gilt aufgrund seiner proliferativer Rezeptorfunktion als Onkogen, dessen gesteigerte Expression bei Mammakarzinompatientinnen mit einem schlechteren Outcome assoziiert ist. Seit 2000 ist der rezeptorspezifische Antikörper Trastuzumab in der EU zugelassen und führte zu einer signifikant reduzierten Mortalität beim Her2-positiven Mammakarzinom. Allerdings zeigen mehr als die Hälfte der Patientinnen eine Resistenzentwicklung.

Die zellulären, molekularen und immunologischen Mechanismen, die einem klinischen Respons bzw. einer Resistenz zugrunde liegen, konnten noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Eine zentrale Bedeutung spielen aber zweifelsfrei die drei dem Her2 verwandten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) Her1, Her3 und Her4, die untereinander wechselwirken und sich in ihrer Signalaktivität gegenseitig verstärken können. In den letzten Jahren ist der Her4-Rezeptor in den Fokus des Interesses gerückt, da dieser, anders als die beiden anderen Her2-Homologen, eine bimodale, zelluläre Aktivität ausüben kann, die sich abhängig von der exprimierten Her4-Isoform vor- oder nachteilig auf ein anti-Her2 Targeting auswirken kann. So ist für diesen Rezeptor einerseits eine pro-proliferative (tumorigene), andererseits aber auch eine pro-apoptotische (anti-tumorigene) Aktivität beschrieben worden. Zusätzlich beeinflussen seine vielfältigen Interaktionen mit den anderen ErbB- sowie dem Östrogen-Rezeptoren das Therapieansprechen der in der Klinik eingesetzten Target-spezifischen Ansätze (z. B. therapeutische anti-Her2 Antikörper, anti-Hormontherapie, Kinase-Inhibitoren) auf noch nicht geklärte Weise.

In der Antikörpertherapie spielen zunehmend nicht nur die bekannten direkten Wirkmechanismen eine Rolle, sondern es steht zunehmend auch ihr indirektes, zellimmunologisch vermitteltes Wirkpotential im Fokus. Hierbei eliminieren v. a. natürliche Killerzellen die antikörperopsonierten Tumorzellen, wobei auch dieser Wirkmechanismus gewissen Resistenzmechanismen unterworfen sein kann.

In der Gesamtbetrachtung muss man derzeit also konstatieren, dass die Bedeutung einer Her4-Expression für ein antigenspezifisches Rezeptortargeting (sowohl für den Einsatz von Antikörpern als auch von Her2- und/oder Her4-spezifischen Kinaseinhibitoren sowie bei einem endokrinen Ansatz) unklar ist und welche zellulären, vor allem aber auch immunologischen Mechanismen bei einem anti-Her2 bzw. anti-Her4 Targeting zum Tragen kommen und möglicherweise klinisch relevant sind.

Vor diesem Hintergrund war es Fragestellung dieser Dissertationsarbeit, die direkten und indirekten Wirkmechanismen einer Target-spezifischen Behandlung von Mammakarzinomzellen unter Berücksichtigung des Her2- und Her4-Rezeptorexpressionsprofils näher zu erfassen. Dazu wurden folgende Ziele formuliert:

- I. Die in vitro Evaluation des direkten und indirekten NK-zellvermittelten Behandlungspotential eines anti-Her2 Targetings an sensiblen Mammakarzinomzellen und an Klonen mit erworbener sowie primärer Trastuzumabresistenz.
- II. Qualitative und quantitative Einordnung des Einflusses einer (Isoform-spezifischen) Her4-Koexpression auf das anti-Her2 Targeting mit rezeptorspezifischen Antikörpern (Trastuzumab, Pertuzumab) und Kinaseinhibitoren (Lapatinib) sowie auf ein anti-ER Targeting mittels Tamoxifen.
- III. Die Beurteilung der therapeutische Wirksamkeit eines anti-Her4 spezifischen Antikörpers.

Die Experimente dieser Arbeit fußen insbesondere auf durchflusszytometrischen und impedanzbasierten Verfahren (real-time impedanzbasiertes xCelligence-System). Zudem wurden Analysen auf proteinchemischer, molekularbiologischer und fluoreszenzmikroskopischer Ebene durchgeführt. Für die Bearbeitung der genannten Fragestellungen kamen zum einen die Her2<sup>+</sup>-Zelllinien JIMT-1 und BT-474 zum Einsatz. Letztere wurden zudem als trastuzumabresistente Klone und nach semistabiler ErbB4-Transduktion näher charakterisiert. Des Weiteren wurden Messungen an den Her4<sup>+</sup>-Zelllinien ZR-75.1, T47D und MCF7 erhoben.

Die immunologischen Versuche wurden mit der immortalen natürlichen Killerzelllinie NK 3.3 (Her2, Her4) und murine Splenozyten (Her4) in Kokultur mit den entsprechenden Zelllinien und therapeutischen Ansätzen durchgeführt.

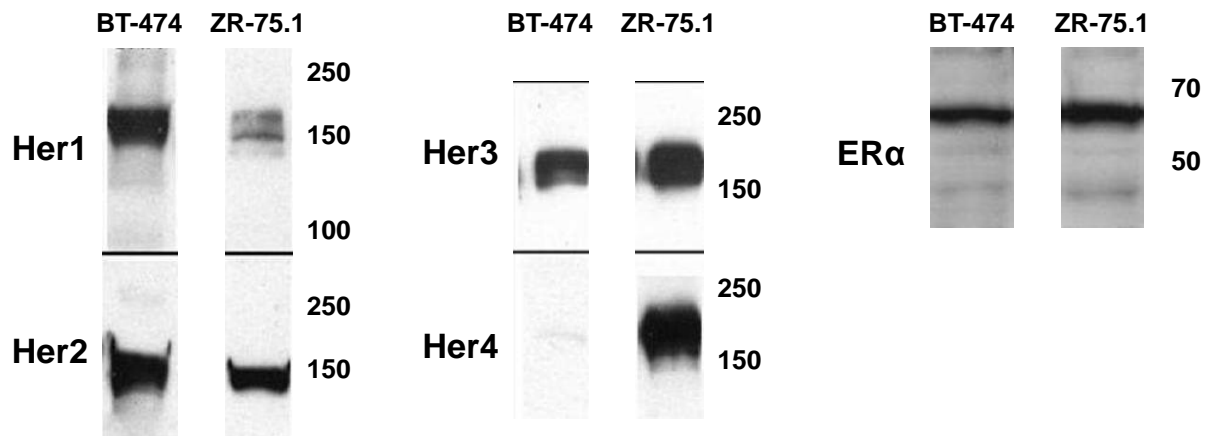
Diese Experimente sollen dazu dienen, den Stellenwert einer Coexpression von Her2 und Her4 beim Einsatz unterschiedlicher zielgerichteter Therapien zu evaluieren und damit eine eventuelle prognostische bzw. prädiktive Bedeutung aufzeigen. Zudem sollen die Kokultivierungen mit Immunzellen Aufschluss über die Bedeutung der indirekten, immunzellvermittelten Wirkmechanismen von anti-Her2 bzw. anti-Her4 Antikörpern geben und damit die Bedeutung von immunmodulatorischen Ansätzen in zukünftigen klinischen Studien verdeutlichen.

### 3 ZELLINIEN UND MATERIALIEN

#### 3.1 UNTERSUCHTE ZELLINIEN

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde v. a. mit den beiden Mammakarzinomzelllinien BT-474 und ZR-75.1 gearbeitet, die jeweils von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen wurden. Beide adhären wachsenden, epithelialen Zellarten unterscheiden sich besonders hinsichtlich ihres Coexpressionsmusters von ErbB-Rezeptoren. Während BT-474 v. a. Her2 überexprimiert, zeichnet sich ZR-75.1 durch seine Her4-Positivität aus (vgl. Abb. 17).

Gerade diese Expression von Her2 und Her4 - als Zielstruktur Target-spezifischer Therapeutika - macht beide Zelllinien zu erfolgversprechenden Modellen für die durchgeführten Arbeiten.



**Abb. 17 Western Blot Analysen an den Brustkrebszelllinien BT-474 und ZR-75.1 hinsichtlich ihres Expressionsprofils.** Bei einem Molekulargewicht von ca. 180 kDa lassen sich die ErbB-Rezeptoren (Her1 bis Her4) nachweisen, bei ca. 67 kDa kommt der ERα (Estrogenrezeptor alpha) zur Darstellung. [Originalbilder]

Für weiterführende, vergleichende Experimente wurden darüber hinaus folgende, sich hinsichtlich ihres Rezeptorstatus unterscheidende Zelllinien ausgewählt:

- **Her2<sup>+</sup>-Zellen:** JIMT-1
- **Her4<sup>+</sup>-Zellen:** MCF7 und T47D
- **triple negative Zellen (TNBC):** BT20, HCC1806, HCC1937, DU4475, MDA-MB-231, MDA-MB-436 und MDA-MB-453

Als Effektorzellen für in vitro Kokulturuntersuchungen wurden des Weiteren murine Immunzellen, humane MNCs (= mononukleäre Zellen) sowie insbesondere natürliche Killerzellen der Linie NK 3.3 eingesetzt. Die MNC-Zellsuspension wurde bei der Aufreinigung von hämatopoetischen Stammzellen aus Nabelschnurblut gewonnen.

**BT-474**

In der Arbeitsgruppe um E. Y. Lasfargues wurde im Jahr 1978 die hypertetraploide Zelllinie **BT-474** aus einem primären Brusttumor einer 60-jährigen, kaukasischen Frau isoliert [ATCC® HTB-20™]. Der Tumor wurde histopathologisch als invasives duktales Karzinom epithelialen Ursprungs mit einem Tumorgading von G2/G3 klassifiziert.

Im Besonderen zeichnet sich BT-474, aufgrund eines amplifiziertes c-erbB2-Gens, durch eine Überexpression von Her2/neu mit ca.  $7 \times 10^5$  Rezeptoren pro Zelle aus<sup>162,163</sup>. Neben Her2 wird ebenso der EGFR sowie der Her3- und Her4-Rezeptor nachgewiesen. Während jedoch der EGF-Rezeptor mit  $7 \times 10^4$  Amplifikaten pro Zelle eine relativ hohe Dichte auf der Plasmamembran aufweist, werden die beiden letzten Vertreter der ErbB-Familie nur schwach in einer Größenordnung von  $1 \times 10^4$  Rezeptoren pro Zelle nachgewiesen. Zudem wurde BT-474 als Östrogen- und Progesteronrezeptor positiv eingestuft.

Interessant für die durchgeführten Versuche dieser Dissertation zum Potential und den Limitationen einer Target-spezifischen Therapie des Mammakarzinoms ist die ausgeprägte Sensitivität dieser Zellen gegenüber einer Behandlung mit dem therapeutischen Antikörper Trastuzumab. Die Zugabe des anti-Her2-Antikörpers Pertuzumab hingegen bewirkt nach S. Diermeier et al. jedoch nur einen geringen antiproliferativen Effekt<sup>131</sup>. Die Kombination beider Antikörper führt jedoch zu einer Potenzierung des reinen Herceptin-Ertrags<sup>163</sup>.

**BT-474<sub>Res</sub>**

BT-474 Zellen wurden über 5 Monate einer Trastuzumab-Dauertherapie [10 µg/ml] ausgesetzt. Unter diesem Selektionsdruck entwickelten einige Mammakarzinomzellen Resistenzen gegen diesen therapeutischen Antikörper und proliferierten auch in Trastuzumab-haltigem Kulturmedium. Diese trastuzumabresistenten **BT-474<sub>Res</sub>** Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C eingefroren (vgl. auch Kapitel 4.1.1.2).

**ZR-75.1**

Die Zelllinie **ZR-75.1** wurde als Isolat einer Aszites-Metastase eines invasiven duktales Mammakarzinoms einer 63-jährigen Patientin erstmals von Engel et al. 1978 kultiviert [ATCC® CRL-1500™]. Diese epithelialen Tumorzellen besitzen einen hypertriploiden Chromosomensatz und exprimieren wie BT-474 Zellen den Her2-Rezeptor. Eine erbB2- Genamplifikation liegt hingegen nicht vor.

Entscheidend für die Auswahl dieser Zelllinie für die vorliegende Arbeit war seine hohe Her4-Expression (vgl. auch 5.3.3) als Zielstruktur des therapeutischen anti-Her4-Antikörpers mAb1479. Außerdem dient sie der funktionellen Charakterisierung einer Her2/Her4-Coexpression. Durchgeführte RT-PCR-Untersuchungen wiesen lediglich die JMa-Isoformen der ErbB4-Splicevarianten nach.

**Weitere Mammakarzinom-Zelllinien**

Für weiterführende, vergleichende Untersuchungen wurden die nachfolgend tabellarisch aufgeführten Zelllinien verwendet. Stichpunktartig werden in der rechten Spalte zentrale Eigenschaften dieser Zellen aufgeführt.

**JIMT-1**

Isolat einer pleuralen Mammakarzinommetastase einer 62-jährigen Frau. Diese Patientin erlitt eine klinische Resistenz gegenüber Trastuzumab, die auch in in vitro Untersuchungen nachweisbar ist. JIMT-1-Zellen besitzen ebenso eine Her2-Überexpression bei einer zugrunde liegenden c-ErbB2 Genamplifikation [DSMZ No. ACC 589].

**MCF7**

Die ER-positiven MCF7 Zellen wurden von Soule et al. 1973 aus der Pleuraeffusion einer 69-jährigen Frau isoliert. Zentrales Auswahlkriterium dieser Zelllinie war die deutliche Her4-Expression [ATCC® HTB-22™].

<b><u>T47D</u></b>	Als dritte Her4 positive Zelllinie wurden die T47D-Zellen ausgewählt. Als ebenfalls ER positive Zelllinie entstammen sie einem infiltrierenden, duktalem Mammakarzinom einer 54-jährigen Patientin [ATCC® CRL-2865™].
<b><u>BT-20</u></b>	Zellen der Zelllinie BT-20, als Isolat eines duktalem Mammakarzinoms einer 74-jährigen Frau wurden erstmals von E. Y. Lasfargues und L. Ozzello beschrieben [ATCC® HTB-19™].
<b><u>HCC1806</u></b>	Die Zelllinie HCC1806 wurde aus einem mäßig differenzierten (G2) Plattenepithelkarzinom einer 60-jährigen Brustkrebspatientin isoliert [ATCC® CRL-2335™].
<b><u>HCC1937</u></b>	Die Zelllinie HCC1937 wurde aus einem gering differenzierten (G3) primär duktalem Mammakarzinom im Stadium IIB einer 23-jährigen Kaukasierin isoliert [(ATCC® CRL-2336™)].
<b><u>DU4475</u></b>	Die Suspensionszelllinie DU4475 entstammt einer Hautmetastase einer 70-jährigen Frau, die an einem fortgeschrittenen, gering differenzierten duktalem Mammakarzinom erkrankte [ATCC® HTB-123™].
<b><u>MDA-MB 231</u></b>	Die TNB-Zellen MDA-MB-231 wurden von Cailleau et al. 1974 erstbeschrieben. Sie entstammen einem Adenokarzinom einer 51-jährigen Frau [ATCC® HTB-26™].
<b><u>MDA-MB-436</u></b>	Die TNB-Zellen MDA-MB-436 wurden ebenfalls von Cailleau et al. charakterisiert. Sie entstammen einem Adenokarzinom einer 43-jährigen Frau [ATCC® HTB-130™].
<b><u>MDA-MB-453</u></b>	Auch die triple negative Zelllinie MDA-MB-453 wurde im Labor von Cailleau erstbeschrieben. Isoliert wurde sie aus einem malignen Perikarderguss einer 48-jährigen Brustkrebspatientin [ATCC® HTB-131™].

### **Natürliche Killerzellen (NK 3.3)**

Als primäre Effektorzellen dieser Promotionsarbeit wurden natürliche Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 verwendet. Dr. Jacki Kornbluth isolierte diesen Zellstamm in Weichagarose über die Aktivierung von peripheren Blutlymphozyten (HLA-A3; B7; DR4/A29; Bw57; DR7) aus einer gemischten Lymphozyten-Kultur<sup>164</sup>. Phänotypisch (CD3<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>-</sup>, CD2<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>) und funktionell sind NK 3.3 Zellen ausschließlich mit charakteristischen Eigenschaften von natürlichen Killerzellen und ohne T-Zellmarker beschrieben. Ihnen wird als Interleukin 2 abhängige NK-Zelllinie eine ausgesprochene Zytotoxizität im Sinne einer ADCC-Reaktion zugeschrieben, wobei diese sowohl über Perforin und Granzyme, als auch über eine Fas-Rezeptorinteraktion vermittelt wird<sup>165</sup>. Zudem scheinen NK 3.3 Zellen ohne weitere zelluläre Stimulation bereits IFN $\gamma$  zu produzieren.

Die NK 3.3 Zellen wurden als Suspensionszellen in RPMI 1640 mit Phenolrot mit 15 % FCS, je 1 % Penicillin und Streptavidin sowie Glutamin und 200 IU/ml rhIL-2 in Gewebekulturflaschen expandiert. Weitere Details zu den Zellkulturbedingungen sind in Kapitel 4.1.1.3 erläutert.

## 3.2 MATERIALIEN

### Medien und Zusätze für die Zellkultur

DMEM Low glucose	PAA Laboratories, Pasching, Österreich;
RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
FCS (Fetal Bovine Serum, Fötales Kälberserum)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
FCS (Fetal Bovin Serum Clone)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PBS (phosphat buffered saline)	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin (200 mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Penicillin-Streptavidin Solution	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

### Chemikalien und Reagenzien

2'-Desoxycytidin (Stocklsg. 5mM in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
5-Bromo-2'-desoxyuridin (Stocklsg. 50mM in H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Acrylamid-Stammlösung (40 %)	Roth, Karlsruhe
APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (30 %)	Biotest AG, Dreieich
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EDTA	Serva, Heidelberg
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Fixation / Permeabilization Concentrate	eBioscience, San Diego
Fixation / Permeabilization Diluent	eBioscience, San Diego
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Golgi™ Stop (Monensin)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
IGEPAL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Roth, Karlsruhe
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Lysepuffer x 10	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Page Ruler Prestained protein ladder	Fermentas, Thermo Fisher; Waltham, USA
Pancoll human (1,077 g / ml)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
Permeabilization Buffer 10x	eBioscience, San Diego
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
PMSF	AppliChem, Darmstadt
Precision Protein Standard	Biorad Laboratories GmbH, München
Protease Inhibitor Cocktail x 7	Roche, Basel, Schweiz
Proteaseinhibitor Cocktail 10x	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
SDS	Merck, Darmstadt
TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tris	Merck, Darmstadt
Türks Lösung zur Leukozytenzählung	VWR International GmbH, Ismaning
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Vectashield mounting media with DAPI	Vector Laboratories, Burlingame, USA
X-treme Gene 9 DNA Transfection Reagent	Roche, Basel, Schweiz
Zellysepuffer	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
ε-Amino-Capronsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### DNA-Farbstoffe, Basenanaloga und Molekulargewichtstandard

#### DNA-Farbstoffe und Basenanaloga

Annexin-V-FITC	ImmunoTools, Friesoythe
BrdU/ DC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
DNA-Farbstoff: GelRed™	Biotium, Hayward, USA



GoTaq Green Master Mix	Promega, Fitchburg, USA
hexanukleotid Random-Primer	Promega, Mannheim, Germany
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
PCR-Primer für isoformspezifische Her4-Analysen	Metabion, Martinsried, Deutschland
PCR-Primer zur Bestimmung des Fcγ-Rezeptor-Polymorphismus	Metabion, Martinsried, Deutschland
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### Molekulargewichtstandard

Molekulargewichtstandard	Biorad Laboratories GmbH, München
DNA Ladder (Ultra Low Range)	Fermentas, Thermo Fisher; Waltham, USA

## Therapeutika, Enzyme und Wachstumsfaktoren

### Therapeutika

Camptothecin (2mM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Lapatinib	GlaxoSmithKline, München
Puromycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Tamoxifen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen

### Enzyme

DNA Taq-Polymerase	Roche, Basel, Schweiz
Endonuklease	Fermentas, Thermo Fisher; Waltham, USA
Reversetranskriptase	Roche, Basel, Schweiz
RNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypsin mit EDTA	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

### Wachstumsfaktoren

rh IL-2	Immunotools, Fiesoythe
rh IL-15	Immunotools, Fiesoythe

## Antikörper

### Primärantikörper

#### **Therapeutische Antikörper**

Trastuzumab (Herceptin <sup>TM</sup> )	Genentech, South San Francisco, CA, USA
Pertuzumab (Perjeta <sup>TM</sup> )	Genentech, South San Francisco, CA, USA
mAb1479 [c=2320 µg/ml]	Genentech, South San Francisco, CA, USA

#### **Primäre FACS-Antikörper**

anti-human CD 16; PE - IgG <sub>1</sub> , kappa	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD 27; PeCy7 - IgG <sub>1</sub> , kappa	eBioscience, San Diego, USA
anti-human CD 3; FITC - IgG <sub>1</sub> , kappa	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-human CD 32; PE - IgG <sub>2b</sub> , kappa	BioLegend, San Diego, USA
anti-human CD 4; FITC - IgG <sub>1</sub> , kappa	eBioscience, San Diego, USA
anti-human CD 56; V450 - IgG <sub>1</sub> , kappa	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-human CD 64; PE - IgG <sub>1</sub> , kappa	BioLegend, San Diego, USA
anti-human ErbB4; PE - IgG <sub>2a</sub> , kappa	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti-human Her2/neu; PE - IgG <sub>1</sub> , kappa	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
anti-human IFNγ; PE - IgG <sub>1</sub> , kappa	BioLegend, San Diego, USA
anti-human Nkp46; APC - IgG <sub>1</sub> , kappa	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-human Perforin; FITC - IgG <sub>2b</sub> , kappa	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CD16/CD32; FITC - IgG <sub>2b</sub> , kappa	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse CD27; PeCy7 - IgG <sub>1</sub> , kappa	eBioscience, San Diego, USA
anti-mouse CD3; PE - IgG <sub>2b</sub> , kappa	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-mouse Nkp46; APC - IgG <sub>2a</sub> , kappa	eBioscience, San Diego, USA
mouse IgG <sub>1</sub> , kappa; APC	eBioscience, San Diego, USA
mouse IgG <sub>1</sub> , kappa; FITC	eBioscience, San Diego, USA
mouse IgG <sub>1</sub> , kappa; PE	eBioscience, San Diego, USA
mouse IgG <sub>1</sub> , kappa; PE-Cy7	eBioscience, San Diego, USA
mouse IgG1, kappa; V450	eBioscience, San Diego, USA
mouse IgG <sub>2b</sub> , kappa; FITC	eBioscience, San Diego, USA
mouse IgG <sub>2b</sub> , kappa; PE	eBioscience, San Diego, USA
Pertuzumab; Cy5 - IgG <sub>1</sub> , kappa	Roche, Basel, Schweiz
Trastuzumab; Cy5 - IgG <sub>1</sub> , kappa	Roche, Basel, Schweiz

#### **Primäre Antikörper für Immunfluoreszenz**

mouse anti-human Her2/neu, FITC, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg
mouse anti-human Nkp46, APC, monoklonal	BD Pharmingen, Heidelberg

**Primäre Antikörper für Western Blot**

mouse anti-human Estrogenreceptor, monoklonal	Leica Biosystems, Wetzlar
mouse anti-human Her2/ErbB2, monoklonal	Millipore S. A., Molsheim, Frankreich
rabbit anti-human Her4/ErbB4, monoklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
rabbit anti-human $\beta$ -Actin, polyklonal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

**Sekundärantikörper****Sekundäre FACS-Antikörper**

goat anti-mouse Antikörper; Alexa Fluor 488	Molecular Probes, Thermo Fisher; Waltham, USA
---	---

**Sekundäre Antikörper für Western Blot**

goat anti-rabbit HRP-konjugierter Antikörper, polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA
horse anti-mouse HRP-konjugierter Antikörper, polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA

**Gebrauchsfertig zusammengestellte Reagenzien (Kits)**

BCA-Protein-Assay-Kit	Pierce, Niederlande/ ThermoScientific
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL-plus Western-Blotting Detection System	Amersham Biosciences, England
EnVision + Dual Link System Peroxidase	Dako Cytomation, Hamburg
Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche Diagnostics GmbH, Basel, Schweiz

**Puffer und Lösungen**

Annexin-Bindungspuffer 10x	0,1 M HEPES 1,4 M NaCl 25mM CaCl <sub>2</sub> pH 7,4; sterilfiltriert
Anodenpuffer I	300 mM Tris-HCl (pH 10,4) 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris-HCl (pH 10,4) 20 % Methanol
AP-Puffer 10x	1M Tris-HCl (pH 7,4) 1M NaCl 25 mM MgCl <sub>2</sub>
APT-Puffer	0,1 % Tween 20 in AP-Puffer 1x
BCA-Arbeitsreagenz	1:50 Mischung aus - Reagenz A (= Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid) - Reagenz B (Kupfersulfat 4 %) Aus dem BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce/ ThermoScientific
DNA-Färbepuffer	DNA-Permeabilisierungspuffer + 40 µg/ml RNase A (50 – 100 Units/mg) + 1,2 µg/ml Hoe 33258
DNA-Permeabilisierungspuffer	DNA-Waschpuffer + 0,1 % IGEPAL
DNA-Puffer	100 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,9 % NaCl 1 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5 mM MgCl <sub>2</sub>
DNA-Waschpuffer	DNA-Puffer + 0,2 % BSA
Einfriermedium	RPMI 10 % FKS 10 % DMSO
FACS-Puffer	PBS 0,01 % NaN <sub>3</sub> 0,007 % FBS
Kathodenpuffer	20 % Methanol 4 mM $\epsilon$ -Amino-n-Caprinsäure (pH 7,6)
Lyse-Puffer zur Gewinnung von Proteinextrakten	100,0 µl Lysepuffer x 10 142,9 µl Protease Inhibitor Cocktail x 7 10,0 µl PMSF 747,1 µl H <sub>2</sub> O
MACS-Puffer	0,5 % BSA 2 mM EDTA

	0,1 % NaN <sub>3</sub> in PBS
Mausserum 1 %	1 : 100-Verdünnung: WT-Maus-Serum in FACS-Puffer
TE-Puffer	25 mM Tris-HCl (pH 7,6) 1 mM EDTA
Transfektionsmedium	DMEM mit 0,2 % Phenolrot 10 % FCS Insulin 10 µg/ml EGF 5 nM HRG 5 nM Polybrene 4 µg/ml Viruskonzentrat 50 Volumenprozent
<u>Zusammensetzung des Polyacrylamidgels:</u>	
Sammelgel (4 % -ig) für 2 Gele	2,97 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,1 ml SDS, Natriumdodecylsulfat (10 %) 650 µl Acrylamid-Stammlösung (40 %) 5 µl TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin 25 µl APS, Ammoniumpersulfat (10 %)
Trenngel (7,5 % -ig) für 2 Gele	5,465 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,1 ml SDS, Natriumdodecylsulfat (10 %) 1,875 ml Acrylamid-Stammlösung (40 %) 10 µl TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin 50 µl APS, Ammoniumpersulfat (10 %)

## Verbrauchsmaterial

0,4 µm Filter	Millipore S. A., Molsheim, Frankreich
16-Well-ePlate; xCelligence-Mikrotiterplatten	Roche Diagnostics, Mannheim
96-Well-Platten	Falcon-BD, Heidelberg
Amiconröhrchen	Millipore S. A., Molsheim, Frankreich
CD34-MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Deckgläser	Engelbrecht GmbH, Edermünde
FACSClean	BD Biosciences, Heidelberg
FACSFlow: Trägerflüssigkeit	BD Biosciences, Heidelberg
FACSShutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg
FACSWash	BD Biosciences, Heidelberg
Gewebe-Kulturflaschen T25, T75, T175	Greiner, Solingen
Kryoröhrchen	Greiner, Solingen
Mikrotiterplatten	Falcon, Heidelberg
Pasteurpipetten	VWR international GmbH, Darmstadt
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Polystyrol Rundbodenröhrchen 5 ml (FACS-Röhrchen)	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran	Roche Diagnostics, Mannheim
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Separationssäule (MS Column)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Universalindikator pH 0-14	Merck, Darmstadt
Whatman Filterpapier	Laborcenter, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Solingen

## Geräte

Biorad 200/2,0 Constant Voltage	Biorad Laboratories GmbH, München
Blot-Apparatur Perfect Blue™	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Semi-Dry' Electro Blotter Sedec™	
Brutschrank BD 6220	Heraeus Sepatech, Osterode
Durchflusszytometer, FACS Canto II	Becton Dickinson GmbH, Biosciences, Heidelberg
Einfriergerät Qualifreeze	LabWare Ltd., Cheshire, England
Eppendorf-Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf-Netheler-Hiz GmbH, Hamburg
Gefrierschrank -20 °C	Colora Messtechnik, Lorch
Gefriertruhe -80 °C (E 80-360 T)	Colora Messtechnik, Lorch
Gelkammer: Mini Protean Tetra cell Elektrophorese-Einheit	Biorad Laboratories GmbH, München
Gieß-Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	Brand GmbH + Co, Wertheim
Glasplatten / Spacer (1mm & short plates)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Sepatech, Osterode
Kühlschrank +4 °C (KU 1503-5)	Liebherr, Biberach
Labovert FS	Leitz Messtechnik GmbH, Wetzlar

Light Cycler (LC) 480	Roche Diagnostics, Mannheim
Milli Q Water System	Millipore S. A., Molsheim, Frankreich
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multistepper, Multipette 478	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop® Spektralphotometer	Thermo Fisher; Waltham, USA
Neubauer-Zählkammer	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & CoKG, Braunschweig
pH-Meter WTW pH522	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co, Weilheim
Photometer: E <sub>max</sub> precision microtiter reader	Molecular Devices, Ismaning
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co.KG, Eberstadt
Primär-Sterilbank	Heraeus Sepatech, Osterode
Schüttler: Polymax 1040	Heidolph Instruments, Schwabach
Spannungsquelle: Consort E455 Elektrophorese	UniEquip, Martinsried
Sterilbank LaminAir HBB 2472 S	Heraeus Sepatech, Osterode
Thermoblock: Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Waage Sartorius R160P	Sartorius, Göttingen
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Western Blot Kammer, Fast blot B33	Biometra, Göttingen
Whatman Fastblotter	Biometra, Göttingen
xCelligence	Roche Diagnostics, Mannheim
Zellzählgerät	Millipore S. A., Molsheim, Frankreich

### Mikroskope

AxioCam MRc	Carl Zeiss AG, Göttingen
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz, Wetzlar
Mikroskop AxioVert 200	Carl Zeiss AG, Jena

### Zentrifugen

Kühlzentrifuge Varifuge 3.2RS	Heraeus Sepatech, Osterode
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Rotina 380 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Sepatech, Osterode
Tischzentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg

### Software

FACSDiva, Version 7	BD Biosciences, San Jose, CA, USA
FlowJo, Version 7.6.1.	Tree Star Inc., USA
GraphPad Prism, Version 6	GraphPad Software, Inc., USA
LightCycler 480 Software	Roche Diagnostics, Mannheim
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation, USA
ModFitLT-Software, Version 3.2	Verity Software House, USA
xCelligence RTCA Software	Roche Diagnostics, Mannheim

## 4 THEORETISCHE GRUNDLAGEN UND METHODEN

### 4.1 METHODEN DER ZELLKULTIVIERUNG UND ZELLPRÄPARATION

#### 4.1.1 Standardzellkultur

Alle Zelllinien wurden als adhärent wachsende Monolayer in Zell-Kulturflaschen (T175, T75, T25) oder 6- bzw. 96-Well-Platen kultiviert und in Brutschränken bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt, 20 % O<sub>2</sub>-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit gehalten. Eine Ausnahme hiervon bildeten die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie die murinen Milzzellen, die als Suspensionszellen kultiviert wurden (vgl. 4.1.1.3).

Als Kulturmedium wurden die in Tab. 3 aufgeführten Nährlösungen verwendet, wobei der Mediumwechsel in zweitägigem Abstand erfolgte.

<u>Her2<sup>+</sup> Zellen</u>	
BT-474	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 5 % FCS
BT-474 <sub>Resistent</sub>	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 5 % FCS + 10 µg/ml Trastuzumab
JIMT-1	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 5 % FCS
<u>Her4<sup>+</sup> Zellen</u>	
ZR-75.1	RPMI 1640 ohne Phenolrot + 5 % FCS
MCF7	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 5 % FCS
T47D	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 5 % FCS
<u>Zellen zur Untersuchung der epigenetischen Reaktivierung von Her4</u>	
BT-20	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 10 % FCS
HCC1806	RPMI 1640 ohne Phenolrot + 10 % FCS
HCC1937	RPMI 1640 ohne Phenolrot + 10 % FCS
DU4475	RPMI 1640 mit 0,2 % Phenolrot + 10 % FCS
MDA-MB-231	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 5 % FCS
MDA-MB-436	RPMI 1640 ohne Phenolrot + 10 % FCS + Glutathion 16 µg/ml
MDA-MB-453	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 5 % FCS
<u>Zellen zur Transfektion von Her4</u>	
Phoenix amphi	DMEM mit 0,2 % Phenolrot + 10 % FCS

Tab. 3 Verwendete Zellkultur-Nährlösungen.

##### 4.1.1.1 Ernten von Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Um Kontaminationen der Zellkulturen zu verhindern, wurden sämtliche zellbiologischen Arbeiten unter einer Sterilbank durchgeführt. Zur Zellernte der adhärenenten Zellen wurden diese, nach Absaugen des ehemaligen Kulturmediums, einmalig mit im Wasserbad erwärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) gewaschen. Nach Zugabe von PBS mit 0,25 % Trypsin und 0,02 % EDTA wurden die Zellen für drei bis fünf Minuten im Brutschrank zur Sicherung der optimalen Bedingungen für die Ablösereaktion inkubiert. Sobald sich die Zellen vollständig abgelöst hatten, wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe

des zweifachen Volumens an FCS-haltigem Medium abgestoppt. Die hierbei notwendigen Volumina korrelierten jeweils mit der Größe der Zellkulturflasche. Die entstandene Zellsuspension wurde in 15 ml bzw. 50 ml Greinerröhrchen überführt und für drei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde anschließend in frischer Nährlösung resuspendiert und vereinzelt.

Vor einer Neuaussaat zur weiteren Kultivierung bzw. in einer Versuchsreihe wurde die jeweils notwendige Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer oder dem Zellzählgerät der Firma Millipore ermittelt.

#### 4.1.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

##### Einfrieren

Nach einer Standardernte (vgl. 4.1.1.1) und Pelletierung bei 1200 rpm für drei Minuten wurden die Zellen in kaltem Einfriermedium (jeweiliges Standardmedium mit je 10 % FCS und 10 % DMSO) vereinzelt. Bevor die Zellsuspension in spezielle Kryoröhrchen überführt wurde, wurde die Zellzahl auf 1 Million Zellen pro 1 ml Volumen eingestellt. Zur Sicherstellung eines möglichst zellschonenden Einfriervorgangs erfolgte dieser langsam über ca. 4 Stunden ( $\sim 1^\circ\text{C}/\text{Min.}$ ) mit einem „Qualifreeze“ Kryo-Einfriergerät. Langfristig wurden die Zellen schließlich bei unter  $-196^\circ\text{C}$  in flüssigem Stickstoff eingelagert.

##### Auftauen

Die Zellen wurden noch als gefrorenes Pellet rasch in ein 15 ml Röhrchen mit sehr kaltem Nährmedium zur Ausverdünnung der zelltoxischen Einfrierlösung überführt und sofort bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Resuspension der Zellen in frischem Medium, wurden die Zellen in T25 Kulturflaschen ausgesät. Bereits am nächsten Tag erfolgte der erste Mediumwechsel. Ab diesen Zeitpunkt wurde die Zellkultur wie unter 4.1.1 beschrieben fortgeführt.

#### 4.1.1.3 Zellkultivierung der natürlichen Killerzellen sowie von murinen Milzzellen

##### NK 3.3

Die zentralen Effektorzellen der vorliegenden Promotionsarbeit bildeten natürliche Killerzellen der Zelllinie NK 3.3. Die NK 3.3 Zellen wurden als Suspensionszellen in Gewebe-Kulturflaschen in einem Standard Zellkulturschrank gezüchtet und in die Cokultorexperimente oder Phänotypisierungsversuche eingebracht.

Als NK-Kulturnährmedium wurde RPMI 1640 mit Phenolrot verwendet, das mit 15 % FKS, je 1 % Penicillin und Streptavidin sowie Glutamin und 200 IU / ml rhIL-2 versetzt wurde. Auch bei diesen Zellen erfolgte der Mediumwechsel dreimal wöchentlich. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde die Zellzahl auf 2,5 bis 3 Millionen Zellen je 10 ml Kulturmedium eingestellt, wobei zur Sicherung einer ausreichenden Nährstoffversorgung jeweils mindestens  $\frac{2}{3}$  des Mediums ersetzt wurde.

Die Effektorzellen wurden maximal für ca. 2 Monaten in Kultur gehalten, ehe neue Zellklone aus dem Stickstofftanks aufgetaut wurden. Dies reduzierte mögliche Veränderungen des Expressionsprofils sowie der Zytotoxizität.

##### Murine Milzzellen

Zur Validierung des immunologischen Potentials des monoklonalen und murinen anti-Her4-Antikörpers mAb1479 wurden als Effektorzellen Milzzellen von Mäusen des Inzuchtstammes CL57/BL6 verwendet.

Nach Gewinnung und Aufbereitung dieser murinen Zellen wurden sie bis zum Einsatz in den jeweiligen Cokultorexperimente unter den gleichen Kulturbedingungen wie die NK 3.3 Zellen gehalten. Als Nährlösung wurde das der NK-Zellen verwendet und zusätzlich mit 1,0 ng/ml rhIL-15 versetzt.

#### 4.1.2 Retrovirale Transduktion von Mammakarzinomzellen

Für die durchgeführten Untersuchungen zur Analyse der prädiktiven Bedeutung einer parallelen ErbB4-Coexpression wurde für die vorliegende Arbeit in die annähernd Her4-Mammakarzinomzellen der Zelllinie BT-474 über episomale Transduktion Her4-kodierende Plasmide eingebracht. Verwendet wurde hierzu das getaggte und kodierende Plasmid pcDNA3.1 Her4-JMaCyt2-HA sowie ein korrelierendes Kontrollplasmid ohne proteinkodierende Sequenz.

Insgesamt wurden folgende Arbeitsschritte zur Erzeugung von semistabil Her4 (ErbB4 JMaCyt2) exprimierenden BT-474 Zellen durchgeführt:

##### Gewinnung der Plasmide

Zur Vervielfältigung der benötigten Plasmide wurden E. coli K12 Bakterien mit dem pBabe-Plasmid, das die genomische Information sowohl des zu transduzierenden ErbB-Rezeptors als auch des Selektionsenzym Puromycinase enthält, transfiziert. Nach der Standardkultivierung der Bakterien und damit Amplifikation der rekombinanten Plasmide, wurden die Suspension aliquotiert und die Plasmide schließlich bei -80 °C gelagert.

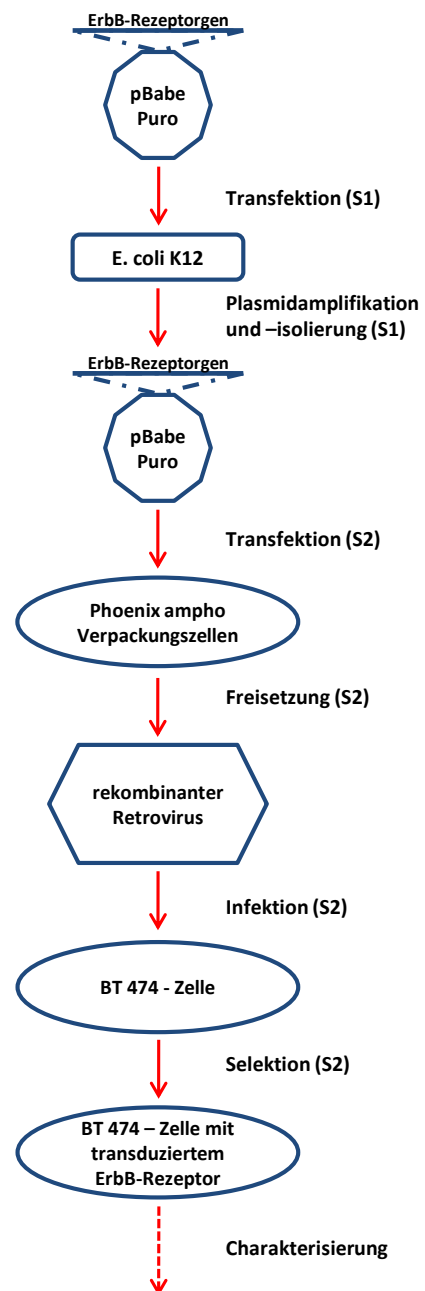
##### Gewinnung der rekombinanten Retroviren

- An **Tag 1** wurden je 20 Millionen Phoenix amphi Zellen in T175-Zellkulturgefäße mit DMEM mit 10 % FKS ausgesät.
- Nach Kontrolle einer 60 - 70 %igen Konfluenz zur Sicherstellung einer optimalen, logarithmischen Wachstumsphase wurden die Phoenix amphi Zellen an **Tag 2** mit dem rekombinanten Plasmiden transfiziert.

Als Transfektionsreagenz wurde hierzu pro T175-Zellkulturansatz 900 µl Optimen, 81,9 µl X-treme Gene 9 DNA Transfection Reagent sowie 24 µg der Plasmid-DNA tropfenweise zu den Phoenix Kulturen gegeben. Diese Verpackungszellen produzieren für Säugerzellen infektiöse Viruspartikel, die sich dort jedoch nicht weiter vermehren können.

Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde zudem jeweils ein Ansatz mitgeführt, der an Stelle von Her4-kodierender DNA, 28 µl eines GFP-kodierenden (= green fluorescent protein) Plasmids enthielt.

- Am folgenden **3. Tag** erfolgte ein Mediumwechsel mit Zugabe von jeweils 22 ml DMEM mit 10 % FKS.
- Die Virusernte wurde 48 Stunden nach der Transfektion der Phoenix amphi Zellen an **Tag 4** durchgeführt. Hierzu wurde der Zellüberstand mit den produzierten rekombinanten Retroviren abgenommen und nach einer vorsichtigen Filtration über einen 0,4 µm Filter für 20 Min. bei 4 °C und 4000 rpm in der Zentrifuge aufkonzentriert. Pro Ansatz konnten derart etwa 200 µl Viruskonzentrat gewonnen werden, das bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurde. Die restlichen Zellen erhielten erneut Kulturmedium und wurden für weitere 24 Stunden im Brutschrank kultiviert.



**Abb. 18 Fließschema zur retroviralen Transduktion von BT-474.**

In Klammern wurde jeweils die notwendige Sicherheitsstufe der Zellkulturarbeiten vermerkt.

[modifiziert nach Diermeier et al.<sup>166</sup>]

- Auch an **Tag 5** erfolgte eine Virusernte entsprechend dem Protokoll des Vortages, nur dass die Phoenixkulturen im Anschluss verworfen wurden.

#### Transfektion der Mammakarzinomzellen der Zelllinie BT-474

- Zur Transfektion der BT-474 Zellen wurden an **Tag 1** jeweils 1 Million Zellen in DMEM mit 10 % FKS ausgesät.
- Nach dreitägigem Anwachsen der Zellen wurden die BT-474 Zellen am **4. Tag** unter S2-Sicherheitsbedingungen mit den rekombinanten Retroviren aus dem Mediumüberstandes der Phoenix amphi Zellen infiziert. Hierzu erfolgte ein Mediumwechsel unter Zugabe von 5 ml virusenthaltendem Transfektionsmedium. Die genaue Zusammensetzung dieser Lösung ist unter 3.2 aufgeführt
- Ein Wechsel des Kulturmediums wurde jeweils am **5., 6., 7., 8., 11., 13. und 15. Tag** durchgeführt, wobei ab dem **6. Tag** Puromycin in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zur Positivselektionierung der transfizierten Zellen zugeben wurde. Nach dreimaligen Passagieren der Zellkultur konnten die transfizierten Zellen unter S1-Sicherheitsbestimmungen weiterkultiviert und in die weiterführenden Charakterisierungsversuche eingebracht werden.

#### **4.1.3 Untersuchung der epigenetischen Expressionsunterdrückung des Her4-Rezeptors**

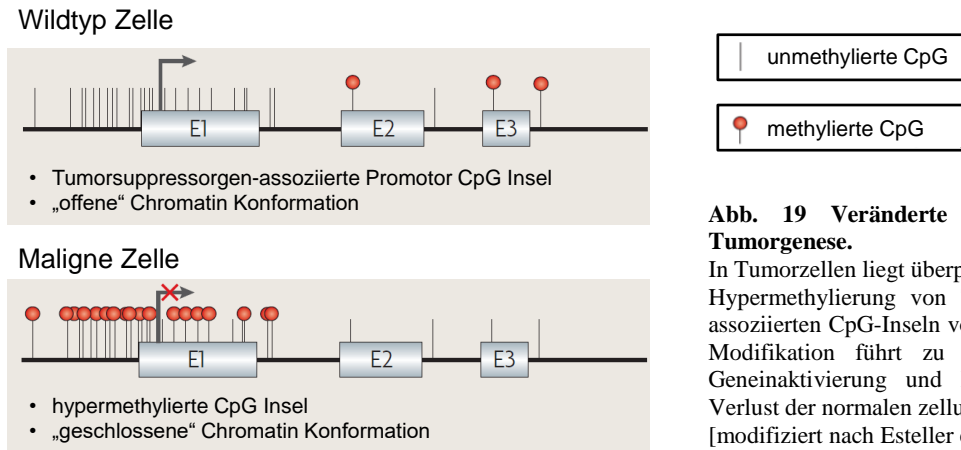
Obwohl alle humanen Zellen mit derselben genetischen Information in ihrer DNA ausgestattet sind, bedingen u. a. epigenetische Unterschiede die unterschiedliche Zelldifferenzierung und die spezifischen Genexpressionsmuster. Zurückzuführen ist diese epigenetische Regulation u. a. auf eine zellindividuelle DNA-Methylierung. Über diese chemische Modulation, insbesondere von Cytosin in den sog. CpG-Inseln im Promotorbereich der Gene erfolgt die gewebespezifische Steuerung<sup>167</sup>. Entsprechend finden sich typischerweise unmethylierte und somit aktive Promotorbereiche vor den Housekeeping-Genen, wohingegen diese in anderen Geweben methyliert und somit inaktiv vorliegen. Biochemisch ist dieser Mechanismus durch eine sterische Hinderung der Transkriptionsfaktorenbindung an die Promotoren durch die Methylierung zu erklären. Zudem können methylierte CpG-Inseln über die Bindung weiterer methylbindender Proteine zu einer Änderung der Chromatinstruktur und somit Genrepression führen.

Vergleichende Analysen an Tumorgewebe und Normalgewebe zeigten, dass in malignen Zellen häufig eine Hypermethylierung von Tumorsuppressor-Gen assoziierten CpG-Inseln vorliegt und auf diese Weise Tumorzellen diese Gene transkriptional deaktivieren<sup>167</sup>. Demzufolge spielen epigenetische Veränderungen eine signifikante Rolle in der Kanzerogenese und der Tumorprogression.

Auch für das Mammakarzinom wurde dieser Zusammenhang zwischen einer veränderten Epigenetik und der aufgehobenen phänotypischen Nachweisbarkeit typischer Tumorsuppressorproteine beschrieben. So konnten beispielsweise Rivenbark et al. für die Mammakarzinomzelllinie MCF7 alleine 20 Gene identifizieren, deren Expression signifikant über eine vermehrte Methylierung unterdrückt ist<sup>168</sup>.

Trotz der ambivalenten und kontrovers diskutierten Stellung des ErbB-Rezeptors Her4 (vgl. 1.2.4.3) wird dieser eher den Tumorsuppressorgenen zugerechnet und seine verstärkte Expression scheint mit einer besseren Prognose von Mammakarzinompatientinnen assoziiert zu sein<sup>67</sup>. Vor diesem Hintergrund war es ein Aspekt der vorliegenden Promotionsarbeit eine Methode zu etablieren, eine epigenetisch-reprimierte Expression von Her4 und somit dessen proliferationshemmende Wirkung zu reaktivieren. Abschließend sollte die Möglichkeit weiter untersucht werden, diese reaktivierten Her4-Rezeptoren selbst als Zielstrukturen einer möglichen anti-Her4-Therapie zu nutzen.





**Abb. 19 Veränderte Epigenetik in der Tumorgenese.**

In Tumorzellen liegt überproportional häufig eine Hypermethylierung von Tumorsuppressor-Gen-assoziierten CpG-Inseln vor. Diese epigenetische Modifikation führt zu der transkriptionellen Geneinaktivierung und konsekutiv zu einem Verlust der normalen zellulären Funktionen. [modifiziert nach Esteller et al.<sup>167</sup>]

## Durchführung

Für die durchgeführten Untersuchungen zur epigenetischen Reaktivierung wurden die beiden Substanzen 5-aza-2-deoxycytidine (DAC) und Trichostatin A (TSA) eingesetzt. Erstere zählt zu den sogenannten DNMT1-Inhibitoren, die die Wirkung der nukleären DNA-(cytosine-5)-Methyltransferase 1 hemmen und somit deren enzymatische Erhaltung des epigenetischen Methylierungsmuster nach DNA-Reparaturvorgängen oder einer Zellteilung unterbrechen. Die Zugabe von DAC führt dadurch zu einem kontinuierlichen Verlust der DNA-Methylierung und schließlich zu einer vermehrten Transkription der unterdrückten Gene.

TSA hingegen ist als sog. HDAC-Inhibitor ein reversibler Hemmstoff der Histon-Deacetylase der Klassen I und II. Die hiermit unterbrochene Deacetylierung mit konsekutiver Hyperacetylierung der Histone führt über die folglich Entfaltung der Chromatinstruktur zu einer erleichterten Bindung von Transkriptionsproteinen und somit zu einer Reaktivierung supprimierter Gene. Da eine synergistische Wirkungen beider Substanzen beschrieben ist, schlossen sich auch Versuche mit Kombinationsbehandlung an<sup>169</sup>.

Der nachfolgend beschriebene Versuchsaufbau orientierten sich an der von P.M. Das und F.E. Jones publizierten Methode<sup>170</sup>. Insgesamt wurden sieben Her4-Zelllinien auf die Reaktivierbarkeit des Her4-Rezeptors gescreent. Neben BT-20, HCC1806, HCC1937, DU4475 wurden die drei triple-negativen MDA-MB-Zelllinien 231, 436 und 453 untersucht. Nach der Aussaat von jeweils 0,2 Mio. Zellen in T25-Gewebekulturflaschen und einer 72-stündigen Anwachsphase erfolgte die Zugabe von DAC, TSA oder beider Substanzen. Die jeweiligen Konzentrationen sind im Ergebnis-Teil dieser Arbeit angegeben und wurden in einem Bereich von 0,05  $\mu\text{M}$  bis 0,2  $\mu\text{M}$  experimentell ausgetitriert. Die eingesetzten Therapeutikamengen orientierten sich dabei sowohl an der lichtmikroskopischen Beurteilung der Zellen bzgl. ihrer Proliferation und ihres Konfluenzverhaltens sowie an durchflusszytometrischen Apoptosemessungen. Entsprechend wurden keine DAC- bzw. TSA-Konzentrationen verwendet, die zu einer signifikanten Proliferationshemmung oder Apoptoseinduktion führten. Da beide Therapiesubstanzen jeweils gelöst in DMSO vorlagen, wurden die Kontrollansätze mit Dimethylsulfoxid ( $c = 1\%$ ) versetzt, um mögliche lösungsmittelinduzierte Nebeneffekte ausschließen zu können. Als Behandlungszeiträume wurden 48 bzw. 96 Stunden gewählt. Entsprechend erfolgte zu diesen Zeitpunkten die Zellernte entsprechend dem in Kapitel 4.1.1.1 beschriebenen Protokoll. Bei den 96 h Ansätzen wurde zudem ein Mediumwechsel mit der erneuten Zugabe der Therapeutika nach 48 Stunden durchgeführt.

Der Nachweis der epigenetischen Her4-Reaktivierung wurde als quantitative RT-PCR (vgl. 4.5) sowie auf Proteinebene mittels Western Blots (vgl. 4.4) durchgeführt.

## 4.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE METHODEN

### 4.2.1 Grundlagen der durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik

Das zentrale Untersuchungsverfahren der vorliegenden Promotionsarbeit war die Durchflusszytometrie mit verschiedensten Assays. Die Grundlage dieses biophysikalischen Verfahrens bildet die simultane Messung und Analyse von optischen Signalen, die beim Durchfluss eines Partikels durch einen Laserstrahl entstehen. Dies ermöglicht die Phänotypisierung von Zellpopulationen, wie beispielsweise Aussagen über ihr Antigenexpressionsprofil oder ihren DNA-Gehalt. Hierbei spielen Fluoreszenz und Lichtstreuung eine zentrale Rolle. Über spezifische Färbungen mit fluoreszierenden Antikörpern oder mit anderen fluoreszenten Färbeverfahren können hierbei in flexibler Weise immunologische, biochemische oder funktionelle Eigenschaften einzelner Zellen in heterogenen Zellgemischen vermessen werden<sup>171</sup>.

Neben der Charakterisierung der Fluoreszenz erfolgt bei jeder FACS-Messung eine Streulichtanalyse, die grundlegende Informationen zum zellulären Aufbau liefert. Hierbei ermöglicht das leicht gebrochene Vorwärtstreulicht (**FSC**, Forward Scatter) unter einem Winkel von 1,5 bis 10 ° zur Strahlenrichtung des Anregungslasers Rückschlüsse auf die relative Größe der Zelle. Das seitliche Streulicht (**SSC**, Side Scatter) in einem Winkel von ca. 90 ° liefert hingegen Aufschluss über die innere Struktur, d. h. die Granularität der Zellen.

Abschließend ist anzumerken, dass das Akronym FACS (= fluorescence-activated cell sorting) historisch zu verstehen ist, da nicht jedes moderne Durchflusszytometer eine Zellsortierung standardmäßig ermöglicht.

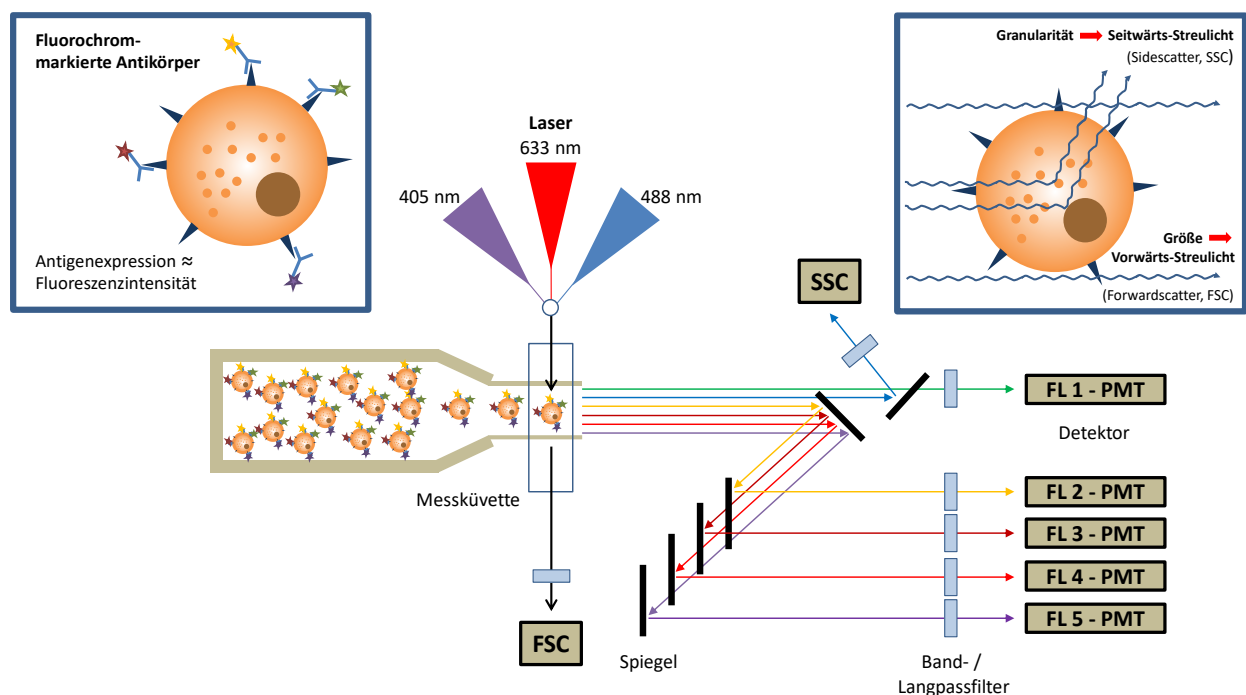


Abb. 20 Schematischer Aufbau eines FACS mit Darstellung der Messmethodik. [Graphik erstellt nach <sup>172</sup> und <sup>173</sup>]

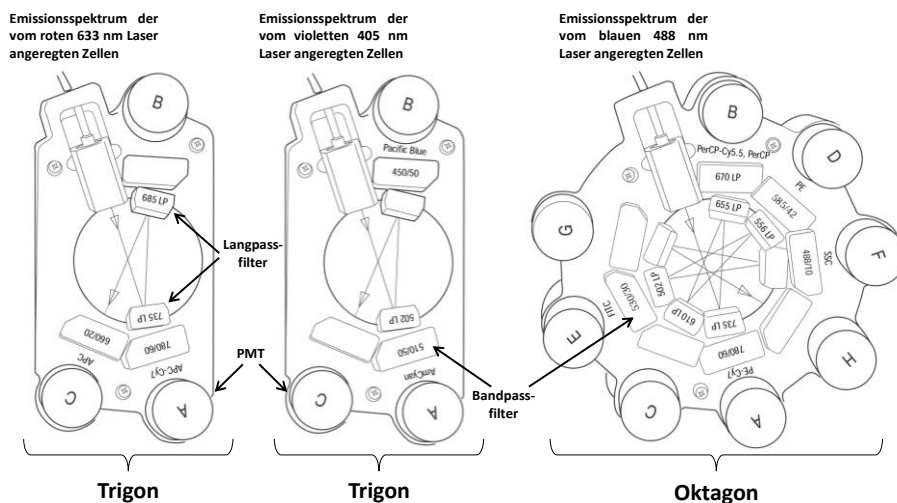
#### 4.2.1.1 BD FACS Canto II

Für sämtliche Messungen dieser Promotion wurde das Durchflusszytometer FACS Canto II der Firma BD Biosciences verwendet. Dieses setzt sich aus den drei Hauptbestandteilen, dem Flüssigkeitssystem (fluidics subsystem), dem optischen System (optics subsystem) und dem elektronischen System (electronics subsystem) zusammen<sup>173</sup>. Vervollständigt wird es als benchtop flow cytometer durch ein geschlossenes Trägerflüssigkeitssystem (selfcontained fluidics cart) sowie eine Steuerungs- und Auswerte-Einheit (BD FACS Canto II workstation)<sup>173</sup>.

Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer BD FACS Canto II ist mit insgesamt drei verschiedenen Lasern ausgestattet, die monochromatisches Licht bestimmter Wellenlänge emittieren: ein luftgekühlter blauer Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm, ein roter Diodenlaser (HeNe) mit 633 nm und ein violetter Festkörperlaser mit 405 nm.

Sämtliche ausgesandten Signale der Zellen werden nach einer Bündelung über eine Sammellinie mittels verschiedener Filter und Farberteilerspiegel den Detektoren spektralverteilt zugeleitet<sup>171</sup>. Im FACS Canto II sind hierzu sowohl Langpassfilter als auch Bandpassfilter verbaut. Erstere ermöglichen nur Licht ab einer bestimmten Wellenlänge die Transmission, während höher energetische Strahlen absorbiert bzw. reflektiert werden. Über Bandpassfilter wird stattdessen Licht auf ein bestimmtes Wellenlängenspektrum begrenzt.

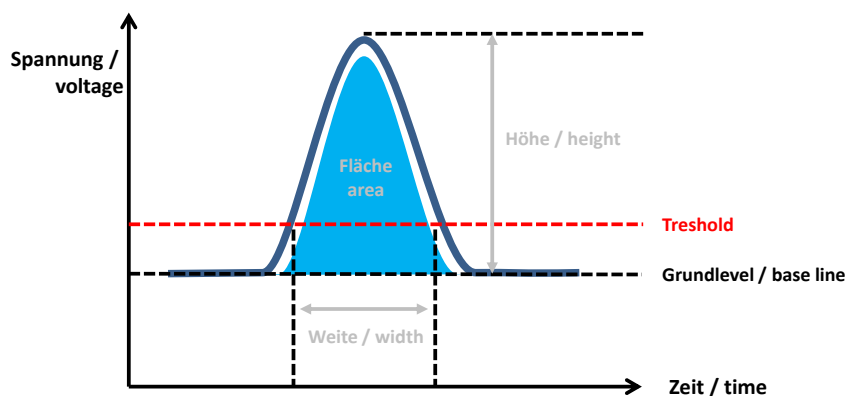
Die Detektion der Lichtsignale und Kodierung in elektronische Werte (= Pulse) erfolgt schließlich für das stärkere Vorwärtstreulicht (= FSC) über eine Photodiode, während die übrigen Signale (SSC und Fluoreszenzen) über Photomultiplier Tubes (PMTs) abgegriffen werden. Letztere sind im verwendeten Durchflusszytometer in einem Oktagon mit fünf Detektoren sowie zwei Trigonon mit bis zu zwei PMTs verbaut. Durch diese Anordnung im Achteck können somit bis zu vier Fluorochrome sowie der SSC-Wert simultan vermessen werden, wobei deren Anregung ausschließlich durch den blauen 488 nm-Laser erfolgt. Die Analyse der Emissionswellen des roten 633 nm- bzw. violetten 405 nm-Lasers findet in den beiden Trigonon statt<sup>173</sup>.



**Abb. 21**  
Graphische Darstellung des optischen System des FACS Canto II in der 4-2-2-Konfiguration (ein Oktagon, zwei Trigonon) mit den möglichen, detektierbaren Fluoreszenzfarbstoffen [modifiziert nach BD Biosciences<sup>173</sup>]

Die Photomultiplier ermitteln über Pulsprozessoren folgende drei Subcharakteristika zu jedem Messsignal<sup>172</sup> und leiten diese an die Auswertungssoftware weiter:

- **H** (= height bzw. Höhe) - Korrelat zur ermittelte maximalen Signalintensität
- **A** (= area bzw. Fläche) - Korrelat zum Integral des gemessenen Pulssignals über die Zeit, wobei dieses mit der gebundene Fluoreszenzmenge korreliert
- **W** (= width bzw. Weite) - Korrelat zum Verhältnis von A und H, berechnet nach der Formel  $W = \frac{area}{height} \times 6400$ , wobei dieser Quotient eine Aussage zur Partikelgröße liefert



**Abb. 22**  
Schematische Darstellung der Subcharakteristika H (= height bzw. Höhe), A (= area bzw. Fläche) und W (= width bzw. Weite) der Messsignal.

[Graphik erstellt nach BD Biosciences<sup>173</sup> und Sack et al.<sup>172</sup>]

Des Weiteren sind für jede FACS-Messung als weitere Grundeinstellung die Base Line als Grundlevel der Messung sowie der Threshold als Grenze, ab der das Gerät die Messimpulse weiter verarbeitet, zu definieren.

#### 4.2.1.2 Farbstoffe

Die nachfolgende Tabelle (vgl. Tab. 4) fasst die im Rahmen dieser Promotion verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe mit den zugehörigen Absorptions- und Emissionsmaxima, ihre Anregungswellenlängen sowie ihre PMT-Position und die zugehörigen Filter im FACS Canto II zusammen.

<b><u>Farbstoff</u></b>	<b><u>Absorptions- maximum [nm]</u></b>	<b><u>Emissions- maximum [nm]</u></b>	<b><u>Anregungs- wellenlänge [nm]</u></b>	<b><u>PMT- Position</u></b>	<b><u>Langpass- und Bandpass-Filter</u></b>
<b>PE-Cy7</b>	496	785	488	A	735 780/60
<b>PI*</b>	488 bzw. 535	590 bzw. 617	488	D	556 585/42
<b>PE</b>	496	578	488	D	556 585/42
<b>FITC</b>	495	519	488	E	502 530/30
<b>APC</b>	650	660	633	C	660/20
<b>DAPI</b>	350	470	405	B	450/50
<b>Hoechst 33258</b>	345	478	405	B	450/50
<b>Pacific Blue</b>	401	452	405	B	450/50

**Tab. 4 Übersicht über die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe.** (\* ungebunden bzw. nach DNA-Interkalierung)

#### 4.2.1.3 Software

Sämtliche durchflusszytometrischen Messungen erfolgten an einem FACS Canto II mit der Standardsoftware FACS Diva in der Version 7 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) an einem PC mit dem Betriebssystem Windows XP. Die generierten Daten wurden als FCS 2.0 und 3.0 (Flow Cytometry Standard) gespeichert und weiter ausgewertet. Diese weiterführenden Analysen erfolgten, gemäß den in den jeweiligen Kapiteln aufgeführten Gating-Strategien, ebenfalls mittels der FACS Diva Software.

Lediglich für die Auswertung der Zellzyklusanalysen wurden weitere Programme eingesetzt. Die Bestimmung der statischen, einparametrischen S-Phase-Fraktion erfolgte mit Hilfe der ModFit LT-Software (Version 3.2) der Firma Verity Software House. Zur Aufarbeitung der dynamischen BrdU/Hoechst-Quenching Messungen und Berechnung der korrelierenden G0-Phase-Fraktion wurde darüber hinaus das Programm FlowJo (Version 7.6) der Firma Tree Star Inc. eingesetzt.

#### 4.2.1.4 Datendarstellung und Datenverarbeitung

##### Kompensation

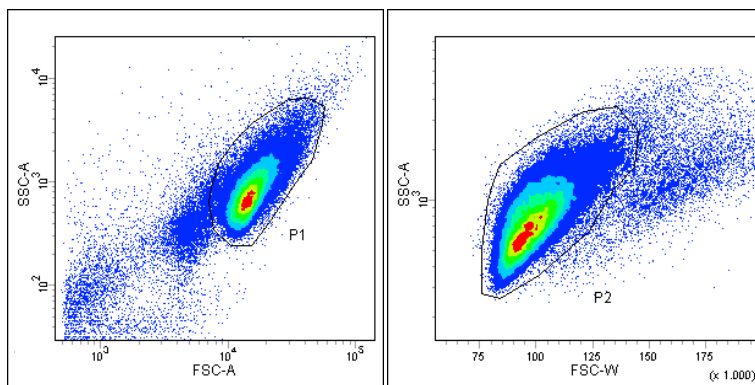
Das Emissionsspektrum eines angeregten Fluorochroms besteht in der experimentellen Praxis neben dem spezifischen Peak auch aus Licht benachbarter Wellenlängen. Trotz der Begrenzung durch Bandpassfilter kommt es durch die spektrale Überlappung von Fluoreszenzfarbstoffen zur „Fehlanregung“ fremder Detektoren. Um diese Fehlmessungen möglichst vollständig zu eliminieren, wurden vor Multicolor-Messungen entsprechende rechnerische Kompensationen durchgeführt. Hierzu wurden sowohl ungefärbte als auch nur einfach fluoreszenzmarkierte Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die falsch-positiven Signale in den fremden Kanälen konnten dann in den Originalversuchen von den ermittelten Werten abgezogen werden. Die

verwendete Software BD DIVA ermöglicht hierbei eine automatische Kompensation der Signale, die jedoch manuell nachbearbeitet werden kann.

### Dubletten, Debris und Gating

Im Fokus sämtlicher Versuche standen Aussagen über spezifische Charakteristika von intakten vitalen sowie toten Einzelzellen. Es galt jedoch Zelltrümmer (Debris), andere Verunreinigungen als auch verklumpte Zelldubletten oder größeren Aggregaten auszuschließen. Neben verschiedenen präanalytischen Präparations-schritten wurden hierzu auch einige Gatingstrategien eingesetzt.

So wurden zuerst sämtliche FACS-Ergebnisse in zweidimensionalen Dot- bzw. Density-Blots graphisch dargestellt, wobei das Vorwärtstreulicht-Signal (FSC) gegen das korrespondierende Seitwärtstreulicht-Signal (SSC) aufgetragen wurde. Durch Festlegung geeigneter Cut-off-Werte bzw. durch Einschließen der zu untersuchenden Zellpopulation gelang eine erste Selektion. Hintergrund dieser Strategie bildet die Tatsache, dass sich der Debris i. a. R. durch niedrige SSC- und FSC-Signale auszeichnet, während große Aggregate aufgrund ihrer Größe und höheren Granularität deutlich höhere Messergebnisse ergeben.



**Abb. 23**

**Gatingstrategie zur Positivselektion der zu untersuchenden Einzelzellen.** [Originalbilder]

**A:** In einem Density-Blot werden die vermessenen Zellen anhand ihres Vorwärtstreulicht-Signal (FSC-A) gegen das Seitwärtstreulicht (SSC-A) aufgetragen. Da sich die intakte Einzelzellen in ihrer Größe und Granularität von Zelldubletten und Zelldebris unterscheiden, konnte diese selektiv ausgewählt werden.

**B:** In einer erneuten Auftragung dieser Zellpopulation konnten letzte Zelldubletten durch erneutes Gating anhand ihres erhöhten Weitensignals aussortiert werden.

Zum effizienten Ausschluss der verbliebenen Zelldubletten wurden zudem die weiteren Subcharakteristika der Messsignale über die Pulsprozessoren ermittelt und ausgewertet (vgl. auch 4.2.1.1). Hier kam insbesondere dem W-Wert des jeweiligen Messpunktes zentrale Bedeutung zu, da Dubletten im Vergleich zu Einzelzellen signifikant mehr Zeit benötigen, den Laserstrahl zu durchqueren und dadurch ein höheres Weiten-Signal besitzen. Exemplarisch wird dies in Abbildung 23 dargestellt. In der experimentellen Praxis wurde hierzu in einem Density-Blot die Signal-Fläche gegen die Signal-Weite aufgetragen und lediglich die linke Population mit den niedrigen W-Werten über ein weiteres Gate für die weiterführenden Auswertungen verwendet.

## 4.2.2 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse

### 4.2.2.1 Zellzyklus

Howard und Pelc postulierten bereits 1953 die bis heute gelehrtete Theorie der eukaryotischen Zellteilung (Zytokinese), nach der sich diese charakteristischerweise in vier verschiedene Zellzyklusstadien gliedert, die sich ihrerseits wieder in zwei Phasen unterteilen lassen.

Die Zellteilung selbst erfolgt als Mitose in der sog. Metaphase (= M-Phase), während das Zellwachstum in die anschließende Interphase fällt. Diese wird klassischerweise in die G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>-Phase untergliedert. Hierbei dient die S-Phase (= Synthese-Phase) zur Replikation der DNA, zur Bildung eines doppelten, sog. diploiden Chromosomensatzes. Die Zellen benötigen die G<sub>1</sub>-Phase (engl.: gap = Lücke) mit Protein- und RNA-Synthese und die G<sub>2</sub>-Phase mit der Verdoppelung der Zellorganellen, die jeweils der M- bzw. der S-Phase vorgeschaltet sind, als Vorbereitungsphase für den nachfolgenden Schritt des Zellzyklus. Mit der mitotischen Teilung in der M-Phase, die die Pro-, Ana-, Meta- und Telophase zusammenfasst, liegt in den beiden Tochterzellen wieder der einfache, identische Genomsatz im Zellkern vor.

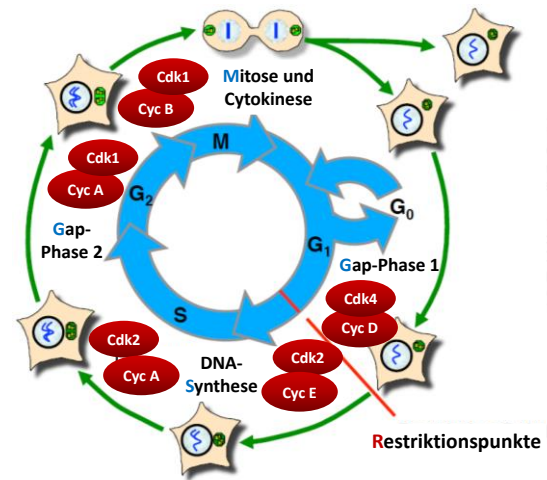


Abb. 24 Schematische Darstellung des Zellzyklus.

[modifiziert nach Hengst et al.<sup>174</sup>]

Zudem unterscheidet die Zellbiologie die sog. G<sub>0</sub>-Phase, die einem zellulären Ruhestadium entspricht, aus dem die Zellen nach Stimulation durch sog. Kompetenzfaktoren (z. B. epidermal growth factor, EGF) und unter bestimmten Bedingungen wieder in den aktiven Zellzyklus eintreten können<sup>172,175</sup>. Auf diese Weise gelingt eine deutliche Reduktion des metabolischen Stoff- und Energieverbrauchs für den Gesamtorganismus.

### Zellzyklus-Regulationscheckpoints

Die oben beschriebene Zytokinese wird insbesondere bei vielzelligen Organismen (= Metabionta) über zahlreiche externe sowie interne Mechanismen, wie dem Angebot von Nährstoffen oder dem Vorliegen spezieller Promoting-Faktoren (z. B. mitose-promoting factor, MPF) reguliert und fortlaufend kontrolliert. Nur wenn an diesen definierten Restriktionspunkten u. a. das zelluläre Genom als fehlerfrei kontrolliert wurde, kann der Zellzyklus in den nächsten Teilschritt eintreten<sup>172</sup>. Diese Überprüfung findet v. a. in der G<sub>1</sub>- und am Ende der G<sub>2</sub>-Phase statt, aber auch während der Mitose wird u. a. die korrekte Genomverteilung auf die beiden Tochterzellen überprüft.

Ziel dieser Kontrollcheckpoints ist es eine Über- oder Unterproliferation der Zellen durch Weitergabe einer genetischen Instabilität oder von DNA-Schäden in die nachfolgenden Zellgenerationen zu vermeiden, um so das Risiko beispielsweise einer malignen Enttarnung möglichst auszuschließen. Ein zentrales Element in dieser Zellzyklusregulation übernehmen Komplexe aus Cyclinen und sog. CDK (cyclin-dependent kinases), deren Expressionsniveau mit dem Ausmaß der mitogenen Stimuli korreliert. Erst über eine CDK katalysierte Phosphorylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren kann die jeweilige Zelle in die nächste Zyklusphase eintreten.

Bei Fehlen dieser notwendigen mitogenen Wachstumsfaktoren oder bei Anwesenheit anti-mitogener Signale (z. B. TGFβ, Zellschädigung) kann es zum Eintreten der Zellen in die G<sub>0</sub>-Phase oder sogar zum induzierten Zelltod (Apoptose) kommen.



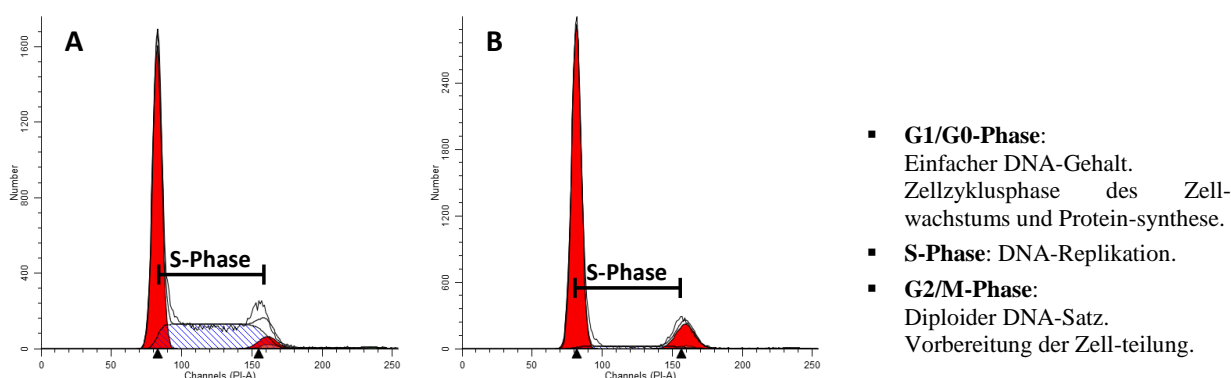
#### 4.2.2.2 Einparametrische DNA-Färbung

##### Theoretische Grundlagen der statischen, einparametrischen S-Phase-Fraktionsmessung

Die durchflusszytometrische Bestimmung der S-Phase-Fraktion (= SPF) als statischer Surrogatparameter für die Proliferationsaktivität einer (Tumor-)Zellpopulation erfolgt anhand eines DNA-Histogramms, in dem der fluoreszenz-markierte DNA-Gehalt einer Zelle gegen die entsprechende Anzahl an gemessenen Ereignissen aufgetragen ist<sup>175</sup>. Auf diese Weise gelingt die Bestimmung der relativen Zellverteilung innerhalb der G1-, S- bzw. G2/M-Phase des Zellzyklus, da die Zellen je nach Zellzyklusphase einen unterschiedlichen DNA-Gehalt aufweisen (vgl. auch 4.2.2.1).

Fluoreszenzfarbstoffe, wie Propidiumjodid (PI) oder 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), interkalieren stöchiometrisch an doppelsträngige DNA, womit die gemessene Farbintensität direkt mit dem Genomgehalt korreliert<sup>175</sup>. Valide Aussagen lassen sich jedoch nur sichern, sofern in einem vorgeschalteten Präparationsschritt sämtliche RNA durch Zugabe von RNase zersetzt wurde. Eine Analyse der Einzelzellen - nach „Ausgaten“ von Detritus und Zelldubletten - ergibt somit zwei definierte Peaks, die den Zellpopulationen in der G1-Phase (links) bzw. in der G2-Phase (rechts) entsprechen. Diese Differenzierung ergibt sich, da die Zelle des G1-Peaks lediglich einen einfachen Chromosomensatz besitzen, während die Zellen der G2-Phase nach der DNA-Replikation in der S-Phase ein diploides Genom aufweisen. Der relative Anteil zwischen diesen beiden Spitzen, also die S-Phase-Fraktion, korreliert mit der Proliferationsaktivität der Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellpopulationen nach Zugabe verschiedener Therapeutika auf ihre S-Phase-Fraktion untersucht. Auf diese Weise konnte das Potential dieser Substanzen die Proliferationsaktivität von Mammakarzinomzellen zu stimulieren bzw. zu hemmen, eingeordnet werden (vgl. Abb. 25).



**Abb. 25 Exemplarische Darstellung zweier statischer Zellzyklusmessungen mit unterschiedlich hoher S-Phase-Fraktion.** **A:** Unbehandelte BT-474 Zellprobe mit einem Anteil von 41,5 % proliferierender Zellen. **B:** BT-474 Zellen, die über 72 Stunden mit 1  $\mu$ M Lapatinib behandelt wurden. Hier beträgt die Zellpopulation in der S-Phase lediglich 5,2%. [Originalbilder]

#### Durchführung

Das in Tab. 5 zusammengefasste Zellkulturprotokoll lag sämtlichen in dieser Dissertation durchgeführten S-Phase-Fraktionsbestimmungen (SPF) zugrunde.

<b>Tag 0</b>	Zellaussaat in T25-Zellkulturflaschen
<b>Tag 3</b>	Wechsel des Zellkulturmediums; 72h-Behandlung
<b>Tag 4</b>	48 h Behandlung
<b>Tag 5</b>	Wechsel des Zellkulturmediums; erneute Zugabe der Therapeutika
<b>Tag 6</b>	Zellernte, Zellzahlbestimmung, Fixierung der Zellen in 70 % CH <sub>3</sub> OH

**Tab. 5 Zellkulturprotokoll zur Messung der S-Phase-Fraktion unter Zugabe Target-spezifischer Therapeutika.**

Die Zellaussaat erfolgte i. d. R. in T25-Zellkulturflaschen mit 5 ml des entsprechenden Mediums (vgl. Tab. 3). Die jeweils ausgesäte Zellzahl orientierte sich dabei an der in Vorversuchen ermittelten Proliferationsgeschwindigkeit der einzelnen Zellarten. In der folgenden Tabelle sind die jeweiligen Zellzahlen zusammengefasst:

<u>Zelllinie</u>	<u>Eingesetzte Zellzahl</u>
1. BT-474 <sub>Wildtyp</sub>	0,3 Mio. Zellen
2. BT-474 <sub>Resistent</sub>	0,3 Mio. Zellen
3. JIMT-1	0,3 Mio. Zellen
4. ZR-75.1	0,5 Mio. Zellen
5. T47D	0,5 Mio. Zellen
6. MCF7	0,5 Mio. Zellen

**Tab. 6 Übersicht über die eingesetzten Zellzahlen für die Messung der S-Phase-Fraktion.**

An Tag 3 schloss sich jeweils ein erster Wechsel des Nährmediums an. Die Target-spezifischen Therapeutika wurden für die 72-stündigen Versuche ebenfalls an Tag 3 zugegeben, für die 48-stündige Behandlung erfolgte die Zugabe an Tag 4. Zur Sicherstellung eines ausreichenden Medikamentenspiegels wurde nach einem Mediumwechsel an Tag 5 stets alle Behandlungen nachgelegt. Die Zellen wurden schließlich an Tag 6 geerntet, ihre Zellzahl bestimmt und mit 70 % Methanol für die weiterführende SPF fixiert.

### **Übersicht über die eingesetzten Therapeutika**

In der nachfolgenden Tabelle werden sämtliche in der vorliegenden Promotionsarbeit im Rahmen der SPF-Assays untersuchten Substanzen inklusive ihrer eingesetzten Dosierung und ggf. notwendigen Lösungsmittel aufgeführt. Zudem wurden z. T. Kombinationsbehandlungen durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden bei sämtlichen Versuchen unbehandelte Ansätze mitgeführt.

	<u>Therapeutikum</u>	<u>Eingesetzte Endkonzentration</u>	<u>Lösungsmittel</u>
1.	Trastuzumab	5 - 10 µg/ml	
2.	Pertuzumab	5 µg/ml	
3.	Lapatinib	0,1 - 1,0 µM	DMSO; c = 1,0 ‰
4.	DMSO	1,0 ‰	
5.	mAb1479	10 µg/ml	
6.	Tamoxifen	5 µM	
7.	Estradiol	2,5 nM	

**Tab. 7 Eingesetzten Therapeutika und ggf. notwendigem Lösungsmittel für die S-Phase-Fraktionsmessungen.**

### **Färbeprotokoll**

Die Zellernte sowie die Zellzahlbestimmung mittels Zellzählgerät bzw. Neubauer-Zählkammer erfolgte wie im Kapitel 4.1.1.1 beschrieben. Jeweils 1 Million der geernteten Zellen wurden - nach einem Waschgang - mit je 1 ml 70 %igen Methanol für mindestens 60 Minuten bei 4 °C im Dunklen fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je ca. 1,5 ml kaltem PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN<sub>3</sub> erfolgte die RNA-Denaturierung durch eine 20-minütige Inkubation bei 37 °C mit jeweils 425 µl PBS + 0,2 % BSA + 0,1 % NaN<sub>3</sub> und 50 µl RNase A (Stammlösung 1 mg/ml, 50 - 100 Units/mg). Zuletzt wurden die Zellen in jeweils 25 µl PI (Stammlösung 1mg/ml; Endkonzentration 50 µg/ml) resuspendiert, kurz gevortext und bei einer Durchflussrate von ca. 300 Events/s am FACS Canto II vermessen. Die Auswertung der prozentualen Zellverteilung in den unterschiedlichen Zellzyklusphase erfolgte nach entsprechenden Gating auf die Einzelzellen automatisiert mittels der ModFit LT-Software (Version 3.2) der Firma Verity Software House.



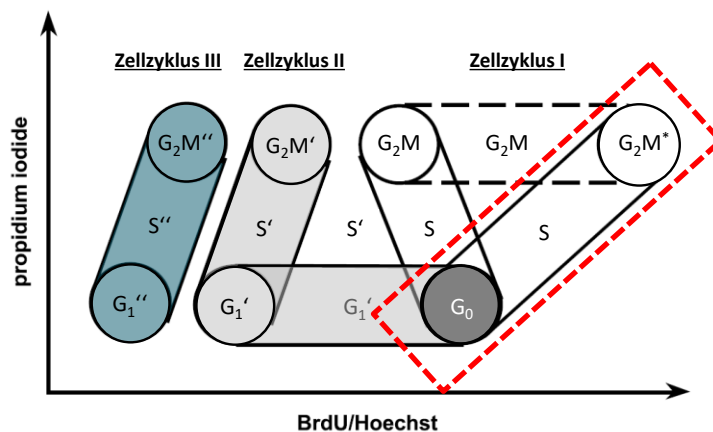
#### 4.2.2.3 BrdU/Hoechst-Quenching Technik zur Bestimmung der G<sub>0</sub>-Phase-Fraktion

##### Theoretische Grundlagen der dynamische BrdU/Hoechst-Quenching Technik

Die durchflusszytometrische Methode des BrdU/Hoechst-Quenchings ermöglicht eine dynamische Analyse der Zellzykluskinetik von Zellpopulationen<sup>175,176</sup>. Hierzu werden die zu analysierenden Zellen über 96 Stunden mit dem Nucleotidanalogen 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) kultiviert, das während dieser Zeit in der S-Phase an Stelle von Thymidin in die DNA der entstehenden Zellen eingebaut wird.

Der spezifische DNA-Farbstoff Hoechst33258 (Hoe), der nichtinterkalierend an Adenin-Thymin-Basenpaare bindet, ermöglicht Rückschlüsse auf die Zellproliferation, da sich mit der sukzessiven Thymin-Substitution durch BrdU, das von Hoe emittierte Fluoreszenzsignal entsprechend reduziert. Dieser analytische Ansatz wird auch als Quenching bezeichnet. Ein weiterer Vorteil von Hoe liegt in seinem Emissionsspektrum ( $E_{\max} = 500$  nm und 470 nm), dessen Intensität nach DNA-Bindung deutlich zunimmt und positiv mit dem AT-Gehalt der Bindungsregion korreliert.

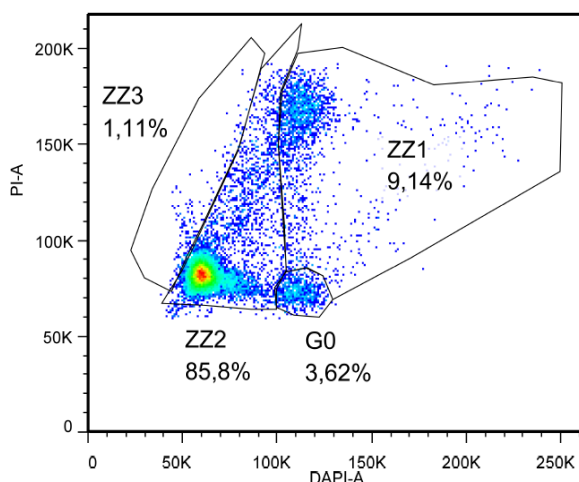
Durch den parallelen Einsatz eines zweiten Fluorochroms wie Propidiumiodid (PI), das unbeeinflusst von einer vorhandenen Basensubstitution stoechiometrisch und kovalent an die DNA bindet, kann ein besseres Auflösungsvermögen erreicht werden. So lassen sich mit dieser nun zweidimensionalen Messung asynchron wachsende Zellen bis in den zweiten und dritten Zyklus, die sich bei einer reinen Hoechst 33258-Analyse weitgehend überlappt hätten, gut unterscheiden<sup>176,177</sup>. Die graphische Auftragung von Hoe (x-Achse) gegen PI (y-Achse) ermöglicht schließlich die Charakterisierung der Zellzyklen der gemessenen Zellpopulationen nach G<sub>0</sub>-, G<sub>1</sub>-, S- und G<sub>2</sub>M-Phase. In Abb. 26 wird schematisch als auch exemplarisch die Auswertung mit der notwendigen Gating-Strategie zusammengefasst.



**Abb. 26 BrdU/Hoechst-Quenching Technik.**

**A:** Schematische Darstellung der zweidimensionalen Auftragung der Fluoreszenzintensität von Hoe (x-Achse) und PI (y-Achse) einer asynchron wachsenden Zellpopulation nach 96-stündiger Inkubation mit BrdU. Die Zellzyklusphasen werden durch die mit G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub>M beschrifteten Kreise symbolisiert. Der zweite bzw. dritte Zellzyklus ist mit einem bzw. zwei zusätzlichen Apostrophen vermerkt. Die atypisch proliferierende Zellfraktion G<sub>2</sub>M\* entstammt jener Zellpopulation, die sich zu Beginn der BrdU-Behandlung in der G<sub>2</sub>M-Phase befand.

[modifiziert nach Ormerod et al.<sup>177</sup> und Diermeier et al.<sup>178</sup>]



**B:** Exemplarische Darstellung einer BrdU/Hoechst-Quenching Messung einer asynchronen BT-474 Population nach 96-stündigen Behandlung mit BrdU. Eingezeichnet wurde die endgültige Gatingstrategie im Hoechts-PI-Blot zur Berechnung der korrigierten und somit vergleichbaren G<sub>0</sub>-Fraktion.

[Originalbild]

Die Fluoreszenzsignale von Hoe und PI verhalten sich bei BrdU-unbehandelten Mammakarzinomzellen bei physiologischer Zellzyklusverteilung direkt-proportional zur DNA-Neusynthese in der S-Phase (vgl. Abb. 26 A, roter Kasten). Sobald eine Zellpopulation nach BrdU-Zugabe in die erste DNA-Replikationsphase (S-Phase) eintritt und somit sukzessiv Thymidin durch BrdU substituiert wird, zeigt sich zunehmend der Quenching-Effekt. Das FACS-Signal von Hoe nimmt dementsprechend kontinuierlich ab, während die PI-Messwerte mit zunehmendem DNA-Gehalt stetig zunehmen. Dieses gegensätzliche Charakteristikum drückt sich in einer nach links verkippten Spur dieser Population aus (vgl. Abb. 26 A,  $G_0 \rightarrow G_2M$ )<sup>177</sup>.

Mit Ende dieses ersten Zellzykluses verteilt sich in der M-Phase die DNA gleichmäßig auf die beiden entstehenden Tochterzellen. Hierbei halbiert sich auch die Hoe- und PI-Signalstärken (vgl. Abb. 26 A,  $G_2M \rightarrow G_1'$ ). Im nun zweiten Zellzyklus wird nun wiederum die Hälfte der verbliebenen 50 % Thymidin-Basen durch BrdU ersetzt. Aufgrund dieser reduzierten prozentualen Substitution (von 50 % im 1. ZZ auf 25 % im 2. ZZ) zeigt sich entsprechend ein schwächerer Quenching-Effekt<sup>176,177</sup>. In Abbildung 26A ist dies als flacherer Anstieg des Hoe-Signals im zweiten Zellzyklus dargestellt ( $G_1' \rightarrow G_2M'$ ). In den weiteren Zellteilungen verhält es sich entsprechend, was sich in den parallelen Auftragungen widerspiegelt.

### **Berechnung der $G_0$ -Fraktion (= Quieszenz)**

Ein weiterer Vorteil dieser dynamischen Proliferationsanalyse im Vergleich zur statischen, einparametrischen Variante (vgl. 4.2.2.2) ist die Möglichkeit neben einer detaillierten Zellzyklusanalyse auch die Zellfraktion in der  $G_0$ -Phase zu berechnen<sup>176</sup>. Grundlage hierfür bildet die spezifische Eigenschaft dieser ruhenden, stoffwechselarmen Zellfraktion, die anders als alle proliferierenden Zellen nicht dem oben beschriebenen Verlauf folgt. Sie lässt sich, auch nach einer Langzeitbehandlung mit BrdU, entsprechend im  $G_0$ -Gate (vgl. Abb. 26A), also am Angangspunkt der  $G_1$ -Zellen des ersten Zellzyklus, den sie nie verlassen hat, finden.

Nach entsprechendem Gating (vgl. Abb. 26B) lässt sich mit Hilfe der nachfolgenden Formel aus den jeweiligen Zellfraktionen in der  $G_0$ -Phase, im ersten Zellzyklus, im zweiten Zellzyklus und ggf. im dritten Zellzyklus die korrigierte vergleichbare  $G_0$ -Fraktion letztlich berechnen.

$$G_{0\text{kor}} = \frac{\%G_0}{\%G_0 + \%ZZ_1 + \frac{\%ZZ_2}{2} + \frac{\%ZZ_3}{4}}$$

**Formel 1**  
**Berechnung der  $G_0$ -Fraktion aus dem BrdU-Assay.**

### **Durchführung**

#### **Zellkultur**

Jeweils 0,25 Mio. Zellen (BT-474<sub>WT</sub> / BT-474<sub>JMaCyt2</sub> / BT-474<sub>JMaCyt1</sub>) wurden - wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben - an Tag 1 in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Nach dreitägigem Anwachsen der Zellen erfolgte am Morgen des 4. Tages ein Mediumwechsel mit der gleichzeitigen Zugabe der Therapeutika zum spezifischen ER-, Her2- und Her4-Targeting. In der nachfolgenden Tab. 8 werden die verschiedenen Therapie- und Kontrollansätze aufgeführt.

	<b><u>Therapeutikum</u></b>	<b><u>Eingesetzte Endkonzentration</u></b>	<b><u>Lösungsmittel</u></b>
1.	Kontrollansatz	-	
2.	DMSO	1,0 ‰	
3.	Lapatinib	1 µM	DMSO; c = 1,0 ‰
4.	Trastuzumab	10 µg/ml	
5.	Pertuzumab	10 µg/ml	
6.	Ab1479	10 µg/ml	
7.	Trastuzumab + Ab1479	10 µg/ml + 10 µg/ml	
8.	Tamoxifen	5 µM	

**Tab. 8 Übersicht über die Therapie- und Kontrollansätze des dynamischen BrdU-Zellzyklus-Assays.**

Acht Stunden nach Behandlungsstart wurde am Nachmittag des 4. Tages 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU) in einer Konzentration von 120 µg/ml und 2'-Desoxycytidin (DC) in halb-äquimolarer Dosierung (60 µg/ml) zu pipettiert. Diese DC-Zugabe reduziert eventuelle BrdU-induzierte Störungen des Nukleotidstoffwechsels. Nach weiteren 48 Stunden, an Tag 6, wurde der Mediumwechsel mit frischen Therapeutika, BrdU und DC wiederholt. Sämtliche Therapie- und Kontrollansätze wurden - wie unter 4.1.1.1 beschrieben - synchron am 8. Tag geerntet. Zur zeitversetzten durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen nach der Ernte in Einfriermedium (vgl. 3.2) mit einer Zelldichte von 1 Mio. Zellen/ml sorgfältig resuspendiert und bei -20 °C eingefroren.

### Färbung

Für die Färbung wurden je Ansatz 0,5 Mio. Zellen im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und zweimal mit jeweils 1 ml kaltem DNA-Waschpuffer (vgl. 3.2) gewaschen. Nach gründlichem Pelletieren (1200 rpm, 4 °C für 5 Min.) wurden die Zellen mit 497 µl DNA-Färbepuffer (vgl. 3.2) permeabilisiert und gefärbt. Hierzu wurden die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden 3 µl PI (c = 0,25 mg/ml) pro Färbeansatz zugegeben. Nach einer weiteren Inkubationsphase im Kühlschrank (4 °C) von mindestens 15 Minuten (besser 90 Min.), wurde die Zellsuspension mit einer Detektionsrate von ca. 300 Events/Sek. vermessen.

## **4.2.3 Apoptose- / Nekrose-Messung mittels Annexin-V-Färbung**

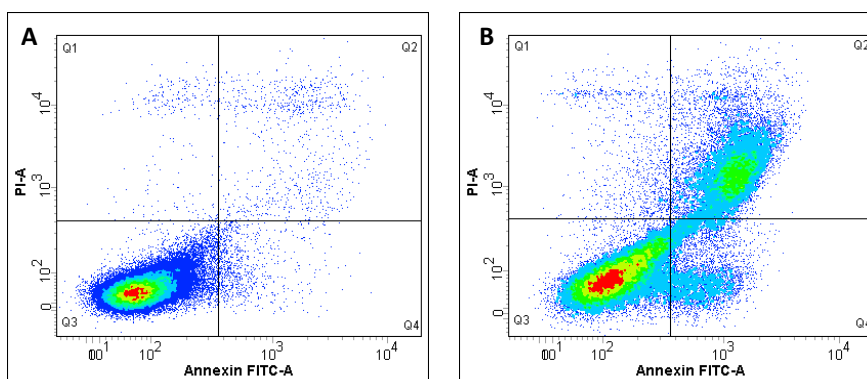
### 4.2.3.1 Theorie

Der Annexin-V-Assay ist ein durchflusszytometrisches Verfahren zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und lebenden Zellen. Die zellphysiologische Grundlage der Annexin-V-Bindung bildet hierbei seine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Affinität gegenüber dem Membranprotein Phosphatidylserin. Bei vitalen, intakten Zellen befindet sich dieser Membranbestandteil lediglich auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran. Bereits in einem frühen Stadium des natürlichen Zelltodes kommt es jedoch zu einer Translokation dieses Phospholipids an die Außenseite der Zelle und somit konsekutiv zur Annexin-V-Bindung<sup>179</sup>. Eine Konjugation des Annexins z. B. mit dem Xanthenfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ermöglicht schließlich die durchflusszytometrische Detektion. Zur dynamischen Einordnung des Apoptosestadiums bzw. zur Abgrenzung gegenüber einer Nekrose wird dieser Assay um eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid (PI) oder 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) ergänzt. Diese Fluoreszenzfarbstoffe können mit der doppelsträngigen DNA der Zellen interkalieren. Diese Bindung darf als Surrogatparameter für ein spätes Stadium des Zelltodes verstanden werden, da erst hier mit dem Verlust der Integrität der Zellmembranen PI bzw. DAPI in den Zellkern gelangen können<sup>179</sup>.

Die Kombination dieser beiden Fluoreszenzfarbstoffe ergibt letztlich folgende drei Zellpopulationen:

- Annexin-V-negativ und PI- bzw. DAPI-negativ  $\Rightarrow$  vitale Zellen
- Annexin-V-positiv und PI- bzw. DAPI-negativ  $\Rightarrow$  früh-apoptotische Zellen
- Annexin-V-positiv und PI- bzw. DAPI-positiv  $\Rightarrow$  spät-apoptotische/ nekrotische Zellen

In Abb. 27 wird diese Zuordnung nochmals beispielhaft an zwei Proben verdeutlicht.



**Abb. 27 1**  
**Density-Plots einer Annexin-V-FITC- und PI-gefärbten BT-474 Zellkultur.**

**A:** Unbehandelte, vitale BT-474 Zellen.

**B:** Camptothecin behandelte BT-474 Zellen. Hier ergibt sich eine deutliche Zunahme der (spät-) apoptotischen Zellpopulation.

[Originalbild]

#### 4.2.3.2 Durchführung an therapierten Monokulturen

Ziel der durchgeführten Annexin-V/PI-Assays war es, die relative Apoptoseinduktion durch eine vorgeschaltete Behandlung von kultivierten Zellen zu vermessen.

Da die v. a. eingesetzten BT-474 Zellen, aufgrund ihrer ausgeprägten Sensibilität gegenüber jeglicher Art der mechanischen Irritation (= diverse Zentrifugations- und Überführungsschritte), auch in den unbehandelten Kontrollen bei einer Färbung nach Herstellerprotokoll einem sehr hohen Apoptoseanteil von bis zu 25 % aufwiesen, galt es in Vorversuchen diese Abläufe zu optimieren und in effektiverer Form in der AG Brockhoff zu etablieren.

Grundvoraussetzung war es folglich sämtliche Schritte inklusive der FACS-Messung unmittelbar nach der Zellernte und unter fortwährender Kühlung (soweit möglich auf Eis) durchzuführen, um ein weiteres Absterben der Zellen möglichst zu verhindern.

Zusammengefasst erfolgte die Annexin-V/PI-Färbung nach folgendem Schema:

- Überführung des Zellüberstandes mit sämtlichen abgestorbenen und somit nicht mehr adhären Zellen in ein 50 ml Greinerröhrchen
- Einmaliges Spülen der Zellen mit 5 ml PBS und Überführen desselben zu obigem Überstand
- Ablösen der adhären Zellen durch Zugabe von 1,5 ml einer 1/10 Trypsin/EDTA-Lösung
- Nach Inkubation bis zur vollständigen Ablösung im Wärmeschrak (ca. 3 - 5 Min.), Zugabe von 3 ml Kulturmedium zur Verdünnung der Enzymlösung und Überführen der Zellsuspension ebenfalls in das Greinerröhrchen
- Nach weiterer Zugabe von 15 ml PBS zur weiteren Verdünnung werden die Proben für 3 Min. bei 1200 rpm und 4 °C zentrifugiert
- Nach diesem Pelletierungsschritt, Resuspension der Zellen in 45 µl Annexin-V/FITC-Lösung (1:10 in Bindungspuffer 1-fach verdünnt) und überführen der Lösung in ein FACS-Röhrchen
- Inkubation im Dunkeln für 20 Min. auf Eis
- Nach Zugabe von 0,20 ml Bindungspuffer 1x wurde genau eine Minute vor der FACS-Messung 3 µl PI (Propidiumjodid, Stockkonzentration 50 µg/ml) zur betreffenden Probe zugegeben. Hiermit ergab sich eine Endkonzentration von 0,6 µg/ml PI

Als Positivkontrollen wurden bei sämtlichen Versuchen Ansätze mitgeführt, bei denen durch Zugabe von Camptothecin (10 µM, 19,5 h) bzw. NaN<sub>3</sub> (180 mM, 4 h) hochsignifikant Apoptose bzw. Nekrose induziert wurde.

#### 4.2.3.3 Durchführung an Cokulturen

Die Apoptoseinduktion in Mammakarzinomzellen durch Effektorzellen v. a. durch natürliche Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 im Sinne einer ADCC-Reaktion wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit u. a. über einen Annexin-DAPI-Assay bewertet. Ziel war es neben der rein qualitativen Beschreibung, auch Aussagen zur Dynamik und zum quantitativen Ausmaß dieses Therapiemechanismus zu ermitteln. Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedenen Versuchsmodifikationen, wie einer Veränderung der Effektor-Target-Zell-Ratio oder der Antikörperkonzentration sowie einer vorgeschalteten Stimulation der Effektorzellen untersucht.

#### Zellkultur

Die Mammakarzinomzellen wurden in je 2 ml Kulturmedium in 6-Well-Platten ausgesät. Die jeweilige Zellzahl pro Vertiefung wurde in Vorversuchen anhand der Proliferationsgeschwindigkeit ermittelt und wird in Tab. 9 zusammengefasst.

<u>Zelllinie</u>	<u>Eingesetzte Zellzahl pro Well</u>
1. BT-474 <sub>Wildtyp</sub>	1,25 x 10 <sup>5</sup> Zellen
2. BT-474 <sub>Resistent</sub>	1,25 x 10 <sup>5</sup> Zellen
3. JIMT-1	1,40 x 10 <sup>5</sup> Zellen
4. ZR-75.1	1,00 x 10 <sup>5</sup> Zellen
5. T47D	0,80 x 10 <sup>5</sup> Zellen
6. MCF7	0,35 x 10 <sup>5</sup> Zellen

**Tab. 9 Zusammenstellung der eingesetzten Zellzahlen pro Well im Annexin-DAPI-Assay.**

Nach einer Anwachsphase über 24 Stunden im Brutschrank wurde bereits das Kulturmedium durch NK-Zellmedium ersetzt und die ADCC-Reaktion gestartet. Hierzu wurden neben den Effektorzellen (natürlichen Killerzellen der Zelllinie 3.3, murine Primärzellen), die therapeutischen Antikörper (Trastuzumab, Pertuzumab, mAb1479) in entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Je nach Fragestellung erfolgte nach 24, 48, 72 und ggf. 96 Stunden gemeinsamer Kultivierung (dynamische Messungen) bzw. definiert nach 48 am maximalen Peak die Ernte der Zellen.

#### Zellernte und Färbung

Die Etablierung des speziellen Ernte- und Färbevorgangs dieses Assays war ein zentraler Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden beschrieben. Da es sich hier um einen Versuch zur Diskriminierung lebendender von toten Zellen handelt und somit optimale Antikörpermarkierungen mit möglichst geringer weitere Zellschädigungen notwendig sind, erfolgen sämtliche Arbeiten - sofern möglich - auf Eis und mit gekühlten Medien.

Das gesamte Kulturmedium mit sämtlichen im Überstand befindlichen Zellen wurde in FACS-Röhrchen überführt, in die bereits 1 ml kaltes PBS vorgelegt worden war. Im Anschluss wurden alle Wells mit je 0,5 ml PBS gespült und diese Suspension ebenfalls in die Röhrchen pipettiert. Das Ablösen der adhären Zellen, das Stoppen mit Kulturmedium und das Überführen der trypsinierten Zellen erfolgt nach dem unter 4.1.1.1 beschriebenen Schema. Nach einem ersten Zentrifugationsschritt (3 Min. bei 1200 rpm und 4 °C) wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer (vgl. 3.2) gewaschen und erneut pelletiert. Zur Reduktion unspezifischer Antikörperbindungen wurden etwaige zelluläre Fcγ-Rezeptoren durch Zugabe von 20 µl 1 %igem Mausserum blockiert.

Der erste Färbeschritt gegen die Zellrezeptoren Nkp46 und Her2 bzw. Her4 diente in den nachfolgenden Apoptosemessungen der Differenzierung der Target- und Effektor-Populationen. Bei Cokulturen aus NK 3.3 und Her2<sup>+</sup>-Zellen (BT-474<sub>WT</sub>, BT-474<sub>Res</sub>, JIMT-1) enthielt der Färbeansatz hierzu jeweils 3 µl anti-NKp46-APC + 10 µl anti-Her2-PE + 47 µl FACS-Puffer. Bei ADCC-Messungen an Her4<sup>+</sup>-Zellen (ZR-75.1, MCF7, T47D) wurde dagegen pro Färbeansatz ein Mastermix aus 3 µl anti-NKp46-APC + 10 µl anti-Her4-PE + 47 µl FACS-Puffer zugegeben. Mit je 2 ml Annexin-Bindungspuffer x 1 (vgl. 3.2) wurden die Zellen nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis gewaschen.

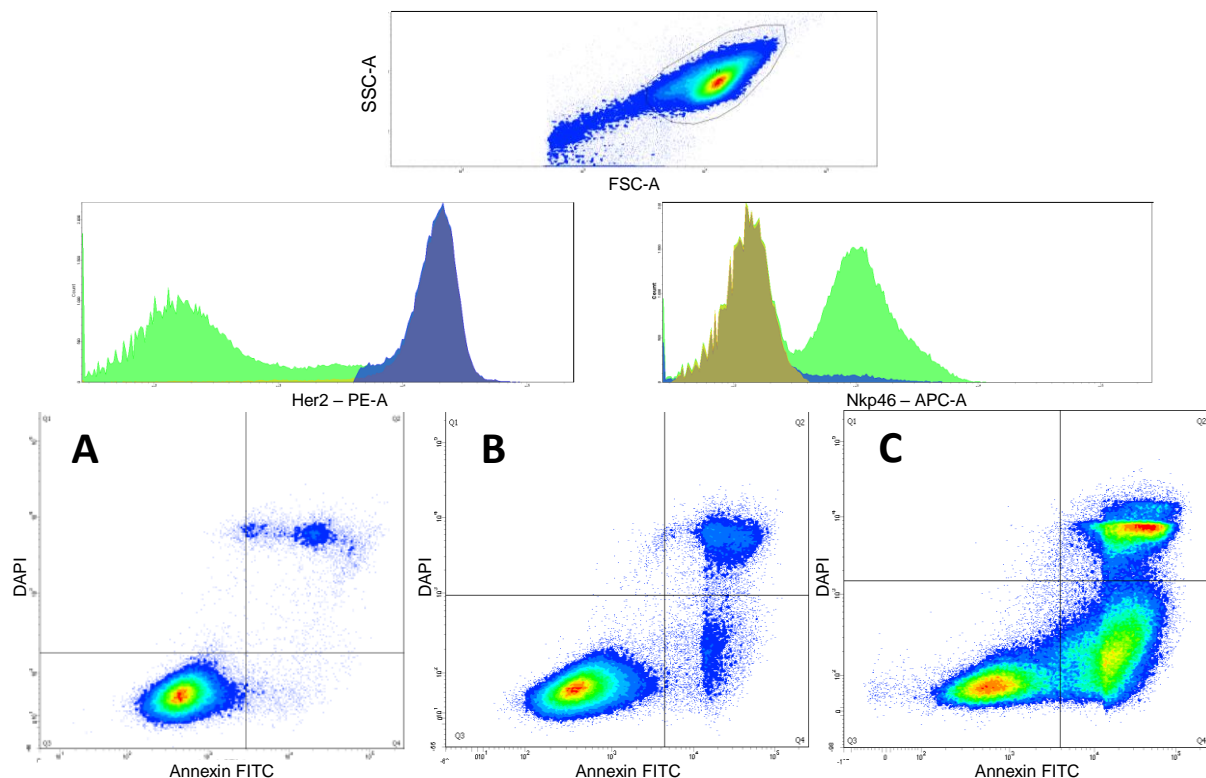
Die Annexin-V-Färbung erfolgte - analog wie unter 4.2.3.2 beschrieben - durch Zupipettieren von je 5 µl Annexin-V-FITC in 70 µl Annexin-Bindungspuffer x 1 und Inkubation auf Eis für 20 Minuten. Mit weiteren 200 µl Annexin-Bindungspuffer x 1 wurden die multiparametrisch gefärbten Zellen schließlich verdünnt.

Die DNA-Gegenfärbung, die bei den Monokulturen mit Propidiumjodid (PI) erfolgte, wurde bei den Cokulturansätzen durch 4',6-Diamidin-2-phenylindol (= DAPI) ersetzt, da hierdurch eine mögliche Spektralüberlagerung zwischen PI und Phycoerythrin (PE) der ErbB2 bzw. ErbB4-Färbung umgangen werden konnte (vgl. 4.2.1.2). Hierzu wurden je 10 µl DAPI zu den Zellen gegeben, eine Minute inkubiert und nach kurzem Vortexen die Proben durchflusszytometrisch am FACS Canto II vermessen.

### Gating-Strategie zur Differenzierung der Zellpopulationen und des Lebend-Tot-Anteils

Für die Versuchsauswertung wurden die vermessenen Zellen zunächst in einem Density-Plot anhand ihrer Größe und Granularität mittels FSC- und SSC-Signal dargestellt und die hier ermittelte Hauptpopulation über die parallel ermittelten Weitensignalwerte von Dubletten und weiteren Zellaggregaten befreit. Eine falsch positive Zelleinordnung im Annexin-V- bzw. DAPI-Kanal konnte derart verhindert werden.

Nach einem weiteren Gatingsschritt, durch den diese Einzelzell-Subpopulation auf Her2<sup>+</sup>- bzw. Her4<sup>+</sup>-Zellen beschränkt wurde, erfolgte schließlich anhand der Annexin-V- und DAPI-Messergebnisse die Analyse hinsichtlich der zellimmunologisch vermittelten Apoptoseinduktion. Die Einteilung in vitale, früh- bzw. spätapoptotische Zellen erfolgte wie in 4.2.3.1 beschrieben und wird - wie die übrige Gatingstrategie - in Abbildung 28 dargestellt.



**Abb. 28 Gating-Strategie des Annexin-DAPI-Assay.** Nach Selektion der Her2<sup>+</sup>- bzw. Her4<sup>+</sup>-Einzelzell-Subpopulation (oben, exemplarische Darstellung einer Kokultur aus BT-474 und NK 3.3 Zellen), wurden die Mammakarzinomzellen hinsichtlich ihre Annexin V-FITC- und DAPI-Signale in vitale, früh- bzw. spätapoptotische Zellen eingeteilt (unten; exemplarische Darstellung von BT-474 + Trastuzumab [A] / BT-474 + NK 3.3 [B] / BT- 474 + NK 3.3 + Trastuzumab [C]).

#### 4.2.4 Oberflächenphänotypisierung

##### 4.2.4.1 Phänotypisierung von NK 3.3 Zellen

Ein zentraler Aspekt der vorliegenden Promotionsarbeit war die Etablierung sowie phänotypische und funktionelle Charakterisierung der natürlichen Killerzelllinie NK 3.3. Hierzu wurde für die NK-Zellen eine multiparametrische Phänotypisierungsmatrix am Durchflusszytometer für die NK-Zellrezeptoren NKp46, CD56, CD27 und den  $Fc\gamma$ -Rezeptor CD16 etabliert. Über diese simultane Mehrfachfärbung können verschiedene Subpopulationen dieser Zelllinie anhand verschiedenstarker Expressionsprofile differenziert werden. Diese Selektion ermöglicht in weiterführenden Experimenten die nähere funktionelle Analyse dieser Subfraktionen, beispielsweise bezüglich ihrem zellulären Aktivierungsausmaß oder ihrer intrazellulären Zytokinsynthese.

Des Weiteren wurden die Zellen der NK 3.3-Linie auch auf die beiden weiteren  $Fc\gamma$ -Rezeptoren CD32 und CD64 hinuntersucht. Zur Validierung der in den Kapiteln 5.2.3 und 5.3 verwendeten Gatingstrategie zur Differenzierung der natürlichen Killerzellen von ihren Targetzellen wurde die fehlende Expression der epithelialen Wachstumsrezeptoren Her2 und Her4 bestätigt. Ein letzter Aspekt dieser durchflusszytometrischen Charakterisierung galt der Abgrenzung der NK 3.3 Zellen von B- und T-Zellen.

#### Durchführung

Jeweils 0,35 Millionen Zellen der Suspensionszelllinie NK 3.3 wurden in FACS-Röhrchen überführt und mit 1,5 ml FACS-Puffer (vgl. 3.2) gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren, erfolgte eine 15-minütige Inkubation der pelletierten Zellen auf Eis in 20  $\mu$ l 1 %igem Mausserum. Da Teile der NK 3.3 Phänotypisierung Zellen als multiparametrische FACS-Messung erfolgten, wurde zu ihrer Etablierung eine Kompensationsmatrix erstellt. Wie unter 4.2.1.4 beschrieben, wurden hierzu neben den mehrfach gefärbten Zellen, ungefärbte sowie nur einfach markierte Zellen vermessen. Über die Software-implementierten Kompensationsalgorithmen wurden die entsprechenden Signalreduktionen für die einzelnen Fluoreszenzkanäle automatisch berechnet.

Folgende Tabelle führt die einzelnen Kontroll- bzw. Färbeansätze auf:

	<u>Fluorochrom</u>	<u>Isotype</u>	<u>V<sub>Färbeantikörper</sub></u>
1.	ungefärbt / Autofluoreszenzkontrolle		
2.	anti-human Nkp46	APC	IgG <sub>1</sub> , $\kappa$
3.	anti-human CD 16	PE	IgG <sub>1</sub> , $\kappa$
4.	anti-human CD 32	PE	IgG <sub>2b</sub> , $\kappa$
5.	anti-human CD 64	PE	IgG <sub>1</sub> , $\kappa$
6.	anti-human CD 27	PeCy7	IgG <sub>1</sub> , $\kappa$
7.	anti-human CD 56	V450	IgG <sub>1</sub> , $\kappa$
8.	anti-human CD 3	FITC	IgG <sub>1</sub> , $\kappa$
9.	anti-human CD 4	FITC	IgG <sub>1</sub> , $\kappa$
10.	anti-human Her2	PE	IgG <sub>1</sub> , $\kappa$
11.	anti-human Her4	PE	IgG <sub>2a</sub> , $\kappa$

Tab. 10 Übersicht über die verwendeten FACS-Antikörper zur Charakterisierung der NK-Zelllinie NK 3.3.

##### 4.2.4.2 Phänotypisierung von murinen Splenozyten

Für weiterführende Untersuchungen zur Einordnung des immunologischen Potentials des murinen anti-Her4-Antikörpers mAb1479 wurden u. a. Cokulturexperimente mit murinen Immunzellen durchgeführt (vgl. Kapitel 5.3.7.2). Diese Effektorzellen wurden aus Mausmilzen des Inzuchtstammes CL57/BL6 gewonnen.

Zur phänotypischen und funktionellen Einschätzung sowie zur Differenzierung der verschiedenen Subpopulationen wurde eine durchflusszytometrische Charakterisierung vorgeschaltet. Hierbei wurden die murinen Zellen mit einem anti-CD3 Antikörper gefärbt, um die im Fokus stehenden natürlichen Killerzellen von T-Lymphozyten unterscheiden zu können. Über eine zusätzliche simultane Mehrfachfärbung gegen die NK-Zellrezeptoren Nkp46, CD27 und die Fcγ-Rezeptoren CD16 und CD32/CD64 wurden die murinen NK-Zellen entsprechend ihrer verschiedenen starken Expressionsprofile weiter differenziert.

### **Durchführung**

Sämtliche nachfolgenden Arbeitsschritte wurden soweit möglich auf Eis durchgeführt. Insgesamt wurden pro Färbeansatz 0,5 Mio. murine Zellen in ein FACS-Tube überführt und mit 1,5 ml FACS-Puffer (vgl. 3.2) gewaschen. Zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen wurde das Zellpellet für 20 Minuten in 20 µl 1 %igem Mausserum im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die fluoreszenzgelabelten Antikörper (vgl. Tab. 11) zu einem Gesamtvolumen von 50 µl FACS-Puffer pipettiert und für mindestens weitere 30 Minuten im Dunkeln und auf Eis inkubiert. Vor der letztlichen Messung am FACS Canto II schloss sich ein letzter Waschschrift an. Hierzu wurde zu den Ansätzen je 1 ml FACS-Waschpuffer gegeben, die Zellen abzentrifugiert und in 250 µl FACS-Puffer resuspendiert.

		<b><u>Fluorochrom</u></b>	<b><u>Isotype</u></b>	<b><u>V<sub>Färbeantikörper</sub></u></b>
1.	anti-mouse CD3	PE	IgG <sub>2b</sub> , κ	1 µl
2.	anti-mouse Nkp46	APC	IgG <sub>2a</sub> , κ	1 µl
3.	anti-mouse CD16/CD32	FITC	IgG <sub>2b</sub> , κ	1 µl
4.	anti-mouse CD27	PeCy7	IgG, κ	1 µl

**Tab. 11 Übersicht über die verwendeten FACS-Antikörper zur Charakterisierung der murinen Immunzellen.**

Aufgrund der multiparametrischen FACS-Messung wurde i. R. der Versuchsetablierung erneut - wie unter 4.2.1.4 beschrieben - eine Kompensationsmatrix erstellt. Außerdem wurden entsprechende Isotypekontrollen zur internen Validierung der Gating-Strategie mitgeführt. Diese wird ausführlich im Ergebnisteil in Kapitel 5.3.7.1 dargestellt.

### **4.2.5 Antikörper-Bindungsfähigkeit von Mammakarzinom-Zelllinien**

Mittels der im folgenden beschriebenen durchflusszytometrischen Methode wurden die Her2-positiven Mammakarzinomzelllinien BT-474<sub>WT</sub>, BT-474<sub>Res</sub> und JIMT-1 auf ihre Fähigkeit hin untersucht, in welchem Ausmaß die humanisierten anti-Her2-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab an sie binden. Diese Messungen wurden zusätzlich um eine Her2-Färbung ergänzt, um mögliche Interaktionen zwischen einer Trastuzumab- bzw. Pertuzumab-Therapie und dem anti-Her2-Detektionsantikörpern nachweisen oder ausschließen zu können.

In weiteren Experimenten wurde die gleiche Technik an den Her4-positiven Zellen ZR-75.1, MCF7 und T75D durchgeführt und hierbei die Bindungsfähigkeit des murinen anti-Her4-Antikörpers mAb1479 gemessen.

### **Durchführung**

#### **ErbB2-Expressionsprofil und Pertuzumab / Trastuzumab-Bindungsfähigkeit**

In T25-Zellkulturflaschen wurden jeweils 0,5 Millionen Mammakarzinomzellen (BT-474<sub>WT</sub> / BT-474<sub>Res</sub> / JIMT-1) ausgesät. Nach 72-stündigem Anwachsen wurde das Kulturmedium gewechselt und hierbei jeweils drei Ansätze mit 10 µg/ml Trastuzumab bzw. Pertuzumab behandelt. 30 Minuten nach Antikörperzugabe wurden sämtlich Zellen geerntet, gezählt (vgl. 4.1.1.1) und pro Ansatz 0,3 Mio. Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Somit ergeben sich pro Zelllinie die in Tab. 12 aufgeführten Untersuchungsansätze.



<u>Vorbehandlung</u>		<u>Färbung</u>	<u>V<sub>Antikörper</sub></u>	<u>V<sub>FACS-Puffer</sub></u>
1.		ungefärbt	-	40 µl
2.		anti-Her2-Pe	20 µl	20 µl
3.		Trastuzumab-Cy5	0,329 µl	39,671 µl
4.		Pertuzumab-Cy5	0,325 µl	39,675 µl
5.	Trastuzumab 10µg/ml 30 Min.	anti-Her2-Pe	20 µl	20 µl
6.		Trastuzumab-Cy5	0,329 µl	39,671 µl
7.		Pertuzumab-Cy5	0,325 µl	39,675 µl
8.	Pertuzumab 10µg/ml 30 Min.	anti-Her2-Pe	20 µl	20 µl
9.		Trastuzumab-Cy5	0,329 µl	39,671 µl
10.		Pertuzumab-Cy5	0,325 µl	39,675 µl

**Tab. 12 Ansätze zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit von Trastuzumab bzw. Pertuzumab an Her2<sup>+</sup> Karzinomzellen.**

Zur durchflusszytometrischen Färbung wurden die Zellen nach Pelletierung (3 Min., 1200 rpm, 300 g, 4 °C) in 2 ml FACS-Puffer (vgl. 3.2) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in der Färbeantikörperlösung resuspendiert. Das Färbevolumen betrug je Ansatz 40 µl. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 4 °C wurden jeweils 2 ml FACS-Puffer zu den Proben gegeben, sie wiederum zentrifugiert und die Überstände verworfen. Dieser Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt, ehe das Zellpellet zur FACS-Messung in 0,25 ml FACS-Puffer resuspendiert wurde.

#### ErbB4-Expressionsprofil und mAb1479-Bindungsfähigkeit

Die vorgeschaltete Zellkultur mit ZR-75.1-, MCF7- und T75D-Zellen orientierte sich an dem oben erläuterten Protokoll der Her2<sup>+</sup>-Zelllinien, wobei hier jeweils 0,3 Mio. Zellen ausgesät wurden. Da für den monoklonalen anti-Her4-Antikörper keine fluorochromkonjugierte Variante zu erwerben ist, wurden die notwendigen FACS-Messungen mittels eines sekundären Alexa Fluor 488 gelabelten Goat anti-Mouse IgG Antikörpers durchgeführt. Hierzu wurden ebenfalls 0,3 Mio. Zellen nach der Ernte in FACS-Röhrchen überführt, mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und in einem ersten Schritt mit jeweils 2,6 µl mAb1479 [c = 2320 µg/ml] für 30 Min. im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt folgte die sekundäre Antikörperfärbung mit einem Goat anti-mouse IgG-Antikörper [c = 2320 µg/ml]. Vor der FACS-Färbung wurden die Zellen ein weiteres Mal in FACS-Puffer gewaschen und in 0,25 ml FACS-Puffer resuspendiert.

Die einzelnen Färbeansätze mit den jeweiligen Färbevolumina sind in Tabelle 13a zusammengefasst.

<u>Zelllinie</u>		<u>Färbung</u>	<u>Primärfärbung</u>		<u>Sekundär Färbung</u>	
			mAb1479	FACS-Puffer	Goat anti-mouse IgG	FACS-Puffer
1.	ZR-75.1 / MCF7 / T75D	unstain	-	20 µl	-	20 µl
2.		sek. AK-Kontrolle	-	20 µl	1,5 µl	18,5 µl
3.		Färbung	2,6 µl	17,4 µl	1,5 µl	18,5 µl

**Tab. 13a Färbeansätze zur Bestimmung der Bindungsfähigkeit von mAb1479 an Her4<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen.**

Auch das Her4-Expressionsniveau auf der Zelloberfläche der untersuchten Zelllinien wurde durchflusszytometrisch analysiert. Das Färbeprotokoll glich hierbei dem oben dargestellten Ablauf. Die einzelnen Ansätze mit den Antikörpervolumina sind in Tabelle 13b zusammengefasst.

<u>Zelllinien</u>		<u>Färbung</u>	<u>V<sub>Antikörper</sub></u>	<u>V<sub>FACS-Puffer</sub></u>
1.	ZR-75.1 / MCF7 / T75D	unstain	-	50 µl
2.		Isotypekontrolle	3 µl	47 µl
3.		Anti-Her4-PE	20 µl	30 µl

**Tab. 13b Färbeansätze zur Bestimmung des zellulären Her4-Expressionsniveau von ZR-75.1, MCF7 und T75D.**

### **Datenanalyse**

Nach Etablierung eines entsprechenden Gating-Protokolls wurden die Ansätze am FACS Canto II vermessen. Die in Kapitel 5.1.5, 5.3.3 und 5.3.4 dargestellten Ergebnisse entstammen jeweils mindestens zweier unabhängiger Experimente.

#### **4.2.6 Intrazelluläre FACS- Färbung**

Das Ausmaß der Interferon  $\gamma$ - und Perforin-Synthese in der Effektor-Ziellinie NK 3.3 wurde als intrazelluläre FACS-Messung in Adaption des „Staining Intracellular Antigens for Flow Cytometry“ Protokolls von eBioscience durchgeführt.

Die initiale Zellkultur zur intrazellulären Perforin- und Interferon  $\gamma$ -Färbung glich der unter Kapitel 4.2.4.1 beschriebenen NK-Zelloberflächenphänotypisierung. Neben einer NK 3.3 Monokultur wurden Kokulturen aus NK 3.3 Zellen mit Mammakarzinomzellen (BT-474) in 6-Well-Platten mit je 2 ml Kulturmedium angesetzt und diese je nach Ansatz mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Trastuzumab behandelt.

<b><u>Ansätze</u></b>
1. NK 3.3
2. NK 3.3 + BT-474
3. NK 3.3 + BT-474 + Trastuzumab [10 $\mu\text{g/ml}$ ]

**Tab. 14 Mono- bzw. Kokulturen zur FACS-Analyse der intrazellulären Interferon  $\gamma$ - und Perforin-Synthese.**

Entscheidend bei dieser Versuchsanordnung war es, 90 Minuten nach Beginn der Kokultur den intrazellulären Vesikeltransport durch Zugabe von jeweils 1,33  $\mu\text{l}$  GogiStop<sup>TM</sup> (BD Biosciences; Endkonzentration: 6,66  $\mu\text{l}$  GogiStop<sup>TM</sup>/10 ml Kulturmedium bei 0,26 % Monensin) zu inhibieren und so die Abgabe der synthetisierten Zytokine in den Überstand zu verhindern. Nach weiteren 12 h wurden die entsprechend mit INF $\gamma$  und Perforin angereicherten Zellen für die durchflusszytometrische Färbung geerntet. Hierzu wurde das Zellpellet für 20 Minuten in 20  $\mu\text{l}$  1 %igem Mausserum blockiert und anschließend eine Oberflächenfärbung (vgl. Kap. 4.2.4.1) zur Selektionierung der NK 3.3 Zellen mit 5  $\mu\text{l}$  anti-NKp46 APC in 50  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer durchgeführt.

Zur Entfernung des überschüssigen Färbeantikörpers wurden die Zellen mit 1,5 ml Permeabilisierungspuffer gewaschen und zur Eröffnung der Zellmembranen sowie zur Fixierung der Zellen in 0,75 ml Fixation&Permeabilization-Lösung (Foxp3 / transcription factor staining buffer set, eBiosciences) für mindestens 30 Minuten inkubiert. Nach einem erneuten Waschschriff mit 1,5 ml Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen nach einem erneuten Blockierungsschritt (20  $\mu\text{l}$  1 %igem Mausserum; 20 Minuten auf Eis) letztlich mit je 3  $\mu\text{l}$  anti-Interferon  $\gamma$ -PE und anti-Perforin FITC in 50  $\mu\text{l}$  Permeabilisierungspuffer intrazellulär über 45 Min. bei Raumtemperatur gefärbt. Ein letzter Waschschriff mit 2 ml Permeabilisierungspuffer und die Resuspension der Zellen in 200  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer schloss die Vorbereitung für die FACS-Messungen ab.

Zur Etablierung der FACS-Messung wurden zusätzlich un- und einfach gefärbte, wie auch korrespondierende isotypegefärbte Ansätze für die Einstellung und Kompensation der interferierenden Fluoreszenzen sowie für das notwendige Gating am Durchflusszytometer vorbereitet.

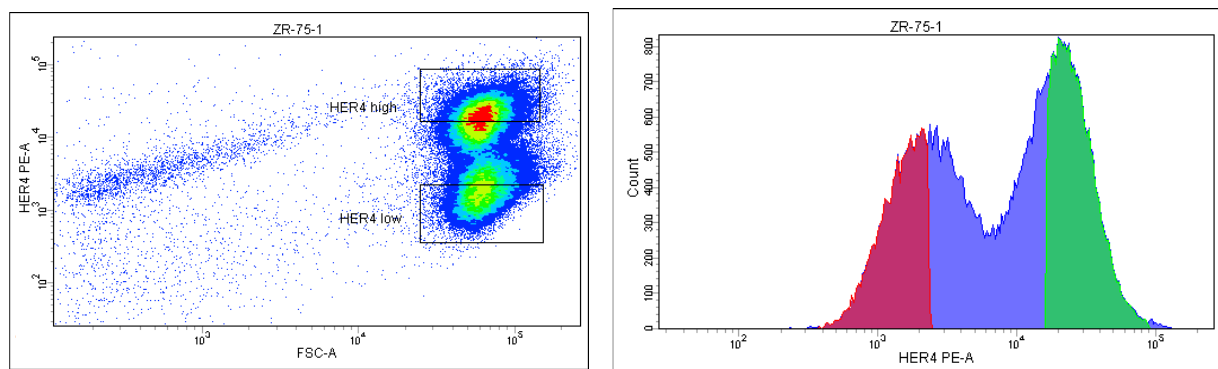
### **Gating-Strategie**

Die Messergebnisse zur intrazellulären Färbung wurden mit der BD FACS DIVA Software (Version 7.0) ausgewertet. Die Gating-Strategie hierzu orientierte sich an der der NK-Zellphänotypisierung. Über die FSC- und SSC-Signale wurden zunächst Zelldetritus und andere Artefakte ausgeschlossen. Nach einer Selektion der Einzelzellpopulationen (= Singlets) über die FSC-Werte wurden alle NKp46-APC positiven Zellen ausgewählt und als NK 3.3 Zellen definiert. In einem weiteren Density Plot wurde diese Zellfraktion weiter bezüglich ihrer INF $\gamma$ -PE- und Perforin-FITC-Fluoreszenzsignale analysiert und als Histogramm graphisch dargestellt.

#### 4.2.7 Zellsortierung mittels Durchflusszytometer

Durchflusszytometer mit Sortiervorrichtung wie das BD FACS Aria II ermöglichen es, verschiedene Zellfraktionen aufzutrennen und so als Subpopulationen weiter zu kultivieren. Hierzu werden die Zellen nach einer klassischen FACS-Charakterisierung elektrostatisch geladen und mit Hilfe eines elektromagnetischen Feldes in die entsprechenden Probenröhrchen abgelenkt.

Die Definition der Zielzellen wurde nach entsprechendem Gating mittels der FACS DIVA Software (Version 7.0) vorgegeben. Experimentell wurden  $1 \times 10^6$  ZR-75.1 Zellen, wie unter 4.1.1.1 dargestellt, geerntet, gezählt sowie im Anschluss entsprechend der Beschreibung in Kapitel 4.2.4 mit dem monoklonalen anti-Her4 PE Antikörper markiert. Nach einem Waschschrift mit kaltem PBS + 0,2 % BSA, wurden die Zellen erneut in kaltem PBS + 0,2 % BSA resuspendiert und auf Eis bis zum Sorting gelagert. Die Zellsortierung wurde in Kooperation mit der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Nach klassischer durchflusszytometrischer Charakterisierung einiger Zellen wurden die Gates wie in Abb. 29 dargestellt zum nachfolgenden Sortierungsschritt festgelegt.



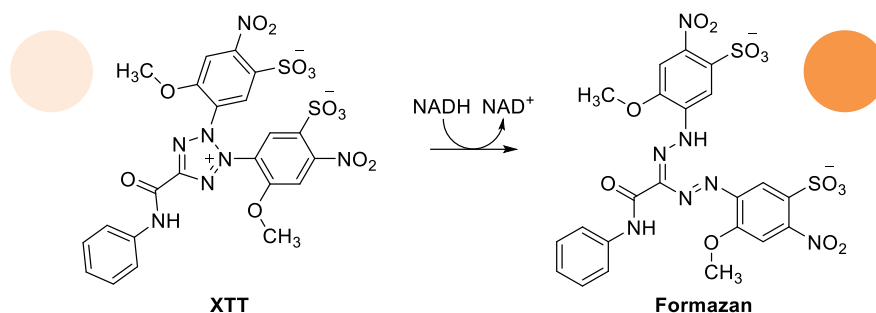
**Abb. 29** Gating-Strategie des durchflusszytometrischen Zellsortings der heterogenen Her4<sup>+</sup> Zelllinie ZR-75.1. [Originalbilder]

In einer durchflusszytometrischen Re-Analyse (Postsort-Analyse) wurde die Reinheit der isolierten Zellfraktionen untersucht und mit > 90 % vermessen. Die isolierten Zell-Populationen wurden daraufhin in Zellkulturmedium resuspendiert und in Gewebekulturflaschen zur weiteren Kultivierung ausgesät.

### 4.3 PROLIFERATIONS- U. METABOLISMUS-UNTERSUCHUNGEN MITTELS XTT-ASSAY

#### Theoretische Grundlagen des XTT-Assays

Dieser quantitative photometrische Assay, der erstmals von Scudiero et al. im Jahr 1988 beschrieben wurde, erfasst Aussagen zur Proliferation, zur Vitalität und zum Metabolismus der untersuchten Zellen<sup>180</sup>. Grundlage des XTT-Assays bildet die extrazelluläre Reduktion des farblosen bis gelben Tetrazoliumsalzes XTT (Natrium-3'-[1-[(phenylamino-)carbonyl]-3,4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nito)-Benzen-Sulfonsäurehydrazid) zum stark-gefärbtem, orangen Formazan<sup>180</sup>. Das hierbei verbrauchte NADH als Oxidationsäquivalent wird durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender, stoffwechselaktiver Zellen bereitgestellt.



**Abb. 30**  
**Biochemische Grundlage des XTT-Assays.**  
Umwandlung des schwach gelben XTT in das rot-orangefarbene, wasserlösliche Formazan durch lebende Zellen.  
[modifiziert nach Roche Diagnostics<sup>181</sup>]

Die Zugabe der intermediären Elektronen-Kopplungsreagenz PMS (N-Methyldibenzopyrazin-Methylsulfat) erhöht hierbei deutlich die Umsetzung von XTT durch die Zellen, vermutlich dadurch, dass es zytosolische Elektronen als reaktive Zwischenstufen für die Redoxreaktion von XTT überträgt.

Der letztlich gebildete Farbstoff wird direkt photometrisch mit Hilfe eines ELISA-Readers ausgemessen, wobei dessen Absorption mit der Vitalität bzw. der Aktivität des zellulären Metabolismus und der Zellzahl korreliert<sup>180</sup>. Diese zellulären Eigenschaften stehen wiederum in Abhängigkeit einer vorgeschalteten Behandlung der Zellen mit verschiedener Target-spezifischer Substanzen.

Der Fortschritt dieses Tests gegenüber anderen Proliferations- und Metabolismusassays liegt zum einen darin, dass weder radioaktive Substanzen, noch zeit- bzw. arbeitsaufwendige Zwischenschritte wie bei wasserunlöslichen Reaktionsprodukten (vgl. MTT-Assay) notwendig sind. Zum anderen ermöglicht der Versuchsaufbau trotz einer Endpunktmessung die Verfolgung des Farbstoffumsatzes unter Zugabe verschiedener Therapieansätze über einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden. So vertreibt der Hersteller den XTT-Assay als ein einfaches, hochvalides, schnelles und kostengünstiges Verfahren bei geringer Inter- und Intratevariabilität auch über lange Inkubationszeiten<sup>180,181</sup>.

Nichtsdestotrotz unterliegt der Versuchsaufbau dennoch einigen Limitationen. Neben klassischen Fehlerquellen wie ungenauer Pipettierarbeit, insbesondere aufgrund der verwendeten Mehrkanalpipetten, der geringen Versuchsvolumina und der langen Inkubationszeiten mit dem Risiko ungleicher Verdunstungsmengen, erlaubt das Testdesign v. a. keine validen Aussagen in der Gegenüberstellung verschiedener Zelllinien. Lediglich die qualitativen Trends unter verschiedenen Behandlungen sollten zwischen verschiedenen Zellarten verglichen werden. Entsprechend zeigte u. a. Scudiero et al., dass neben der reinen Zellzahl auch einigen weiteren Faktoren, wie der pH-Wert der Lösung, die zellulären Ionenkonzentrationen oder die mitochondriale Enzymregulation Einfluss auf die gebildete Menge des orangefarbenen Reaktionsproduktes nehmen<sup>180,182</sup>. Um diese Schwankungen auf ein Minimum zu reduzieren, wurde das Herstellerprotokoll wie unter Abschnitt 4.3 beschrieben um einige Modifikationen ergänzt.

### Durchführung

Für die vorliegenden Proliferations- u. Metabolismusuntersuchungen wurde das „Cell Proliferation Kit II (XTT)“ der Firma Roche Diagnostic GmbH (Mannheim) verwendet. Die Durchführung orientierte sich an den Herstellerangaben.

Mammakarzinomzellen der Zelllinien BT-474 und ZR-75.1 wurden im dreifachen Ansatz mit einer Zellzahl von 6000 Zellen/Well, 3000 Zellen/Well sowie 2400 Zellen/Well in jeweils 200 µl Kulturmedium (vgl. 4.1.1) in einer 96-Well-Platte (zellkulturbeschichtet, flat bottom) ausgesät. Da sich in den äußeren Vertiefungen der Platten signifikant vermehrter Medienverlust über die Verdunstung zeigte, wurde der Versuch lediglich in den zentralen Wells durchgeführt und die peripheren Löcher mit Kulturmedium befüllt.

Nach einem zweitägigen Anwachsen der Zellen wurde das Kulturmedium vorsichtig abgenommen ohne den empfindlichen Zellrasen zu berühren und die Zellen mit frischem Medium überschichtet. Zeitgleich erfolgte die Zugabe der einzelnen Therapeutika (Antikörper, Tyrosinkinaseinhibitoren, Lösungsmittel, etc.). Die jeweiligen Therapiekonzentrationen sind nachfolgend in Tabelle 15 aufgeführt. Als Kontrolle dienten Tumorzellen, die entweder nur mit frischem Kulturmedium oder mit Lösungsmittel der Therapeutika inkubiert wurden.

	<u>Therapeutikum</u>	<u>Eingesetzte Endkonzentration</u>	<u>Lösungsmittel</u>
1.	-		Negativkontrolle
2.	Trastuzumab	10 µg/ml	
3.	Pertuzumab	10 µg/ml	
4.	Tamoxifen	5 µM	
5.	Lapatinib	1 µM	DMSO [1 %]
6.	DMSO	1 %	Kontrolle für Lapatinib-Ansätze
7.	mAb1479	10 µg/ml	
8.	NaN <sub>3</sub>	180 mM	Positivkontrolle für ZR-75.1
9.	Camptothecin	2 mM	Positivkontrolle für BT-474

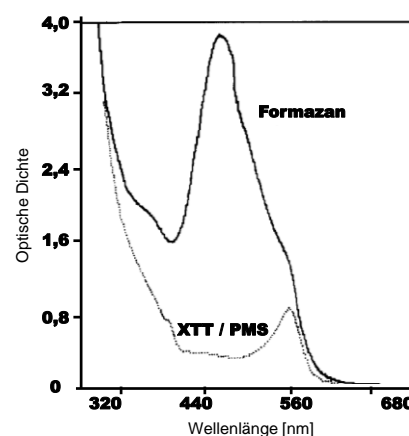
**Tab. 15 Übersicht über die eingesetzten Therapeutika mit den jeweiligen Endkonzentrationen in den XTT-Assays.**

Nach 4- bzw. 7-tägiger Behandlung - hier erfolgte nach 4 Tagen ein Mediumwechsel - wurden die Zellen in den XTT-Assay eingebracht.

Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen und möglichst ohne Lichteinfall das XTT-Reaktionsgemisch („XTT labeling mixture“), aus jeweils 50 µl XTT-Reagenz und 0,5 µl PMS hergestellt. Dieser 100:1-Ansatz wurde für jede Messung frisch angesetzt, da die Substanzen in Kombination nur wenige Stunden stabil bleiben.

Nach sorgsamer Abnahme von 100 µl Kulturmedium aus jedem Well, wurden jeweils 50 µl der obigen, auf 37 °C erwärmten Lösung auf die Zellen pipettiert und die gesamte Zellkulturplatte im Dunkeln für ca. 3 Minute auf einem Orbitalshaker gemischt.

Die progrediente Umsetzung des XTTs zu farbigem Formazan wurde nach 1, 2, 3, 4 und 6 sowie nach 24 h mittels eines ELISA-Readers (Molecular Devices, Ismaning) am Absorptionsmaximum von 492 nm gegen die Referenz-Wellenlänge von 690 nm vermessen (vgl. Abb. 31). Zwischen den einzelnen Messungen wurden die Zellkulturplatten im Brutschrank weiter bei 37 °C inkubiert.



**Abb. 31**  
**Absorptionsspektren von XTT/PMS und Formazan.**

[modifiziert nach Roehm et al.<sup>182]</sup>

## Statistische Analyse

Die Ergebnisse dieses Proliferations- und Metabolismustests werden im Ergebnissteil dieser Arbeit deskriptiv als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (Standard Error of the mean; SEM) dargestellt, wobei die einzelnen Versuche als dreifacher Ansatz durchgeführt wurden. Jeder Ansatz wurde mindestens zweifach unabhängig wiederholt. In diesen Wiederholungsexperimenten bestätigten sich zwar die qualitativen Aussagen, aufgrund verschieden großer Absolutwerte wurde auf eine kumulative Darstellung der Daten jedoch verzichtet und stattdessen ein repräsentatives Beispiel in dieser Arbeit abgedruckt.

Statistische Unterschiede innerhalb einer Versuchswiederholung wurden bei einem Signifikanzniveau von  $P < 0,05$  im Programm GraphPad Prism 6.0 berechnet und entsprechend vermerkt.

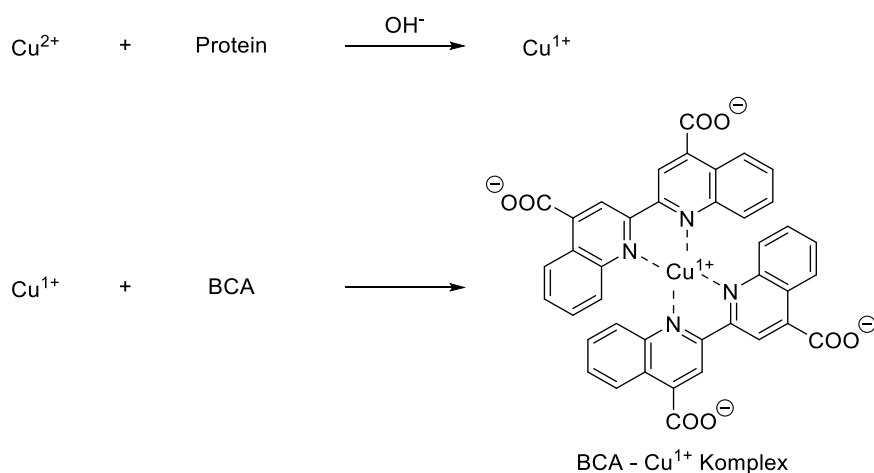
## 4.4 PROTEINCHEMISCHE METHODEN

### 4.4.1 Gewinnung von denaturierten Zellextrakten

Die adhärent wachsenden Zellen wurden - wie unter 4.1.1.1 beschrieben - geerntet, gezählt und schließlich 1,5 Mio. Zellen davon in ein 15 ml Falcon überführt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kaltem PBS, wurde sie mit 130  $\mu$ l Lysepuffer (vgl. 3.2) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die entstandene Zell-Protein-Suspension wurde in ein Eppendorfcup überführt und bei nun eröffneter Zellmembran über 10 Minuten bei 13.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Auf diese Weise wurde das Proteinlysate von zellulärer DNA und weiteren Zellorganellen befreit. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Gefäß, nach Abnahme eines 5  $\mu$ l Aliquots zur Bestimmung der Proteinkonzentration, überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C eingefroren.

### 4.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay-Kit

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die Proteinquantifizierung erfolgt hierbei als Biuret-Reaktion, bei der im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$ -Ionen zu  $\text{Cu}^+$ -Ionen reduziert werden. Die gebildeten  $\text{Cu}^+$ -Ionen bilden mit Bicinchoninsäure (2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure, bicinchoninic acid, BCA) einen violett-purpurroten, wasserlöslichen und stabilen 2:1 Chelat-Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm<sup>183</sup>. Da sich die Intensität des Farbumschlags dieser Reaktion proportional zur Protein-Konzentration verhält und photometrisch detektiert werden kann, lässt sich über einen Vergleichsstandard auf den Proteingehalt der untersuchten Probe zurückrechnen.



**Abb. 32**  
Chemischer Reaktionsweg des  
BCA-Protein-Assays mit  
Bildung eines violett-  
purpurroten BCA-Kupfer-  
Komplexes.  
[modifiziert nach Smith et  
al.<sup>183</sup>]

### **Durchführung**

Der BCA-Protein-Assay wurde in einer 96-Well-Mikrotiterplatte durchgeführt, in dessen Vertiefungen jeweils 10 µl der 1:10 in TE-Puffer (vgl. 3.2) verdünnten Proteinlysate (Herstellung vgl. 4.4.1) sowie eine Proteinstandardlösung (25 - 2000 µg/ml BSA in TE-Puffer) pipettiert wurden. 10 µl TE-Puffer dienten als Negativkontrolle.

Im Anschluss wurden die Proben durch Zugabe von jeweils 200 µl Arbeitsreagenz 1:20 verdünnt. Diese Lösung besteht aus einer 1:50 Mischung der im BCA-Protein-Assay-Kit von Pierce/ ThermoScientific enthaltene Reagenzien A und B (vgl. 3.2). Nach sorgfältigem Vermischen auf einem Plattenschüttler und anschließender Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C, wurde die Absorption bei 562 nm gegen eine Referenz bei 540 nm mit einem ELISA-Reader vermessen. Die Proteinkonzentration in den zu untersuchten Lysaten konnte anhand einer Standardreihe der aufgetragenen Proteinstandardlösung extrapoliert werden.

### **4.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

U. K. Laemmli beschrieb 1970 erstmals, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendete, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), die eine Auftrennung des zu untersuchenden Proteingemisches anhand seiner molekularen Masse ermöglicht. In einem unidirektionalen Spannungsfeld erfolgt dabei die Separierung der Lysate nur mehr anhand des jeweiligen Proteingewichtes, da durch SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) sämtliche sekundären und tertiären Strukturen denaturiert und alle Bestandteile gleichsam negativ geladen wurden. Der Vorteil dieses diskontinuierlichen Verfahrens, bestehend aus einem engporigen Trenngel und einem weitporigen Sammelgel, ist, dass ein Aggregieren von Proteinen verhindert wird und so schärfere Proteinbanden erreicht werden.

### **Durchführung**

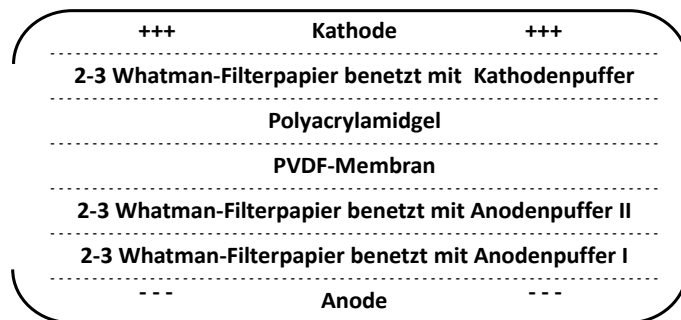
Die vorliegenden Versuche wurden in der Mini Protean Tetra cell Elektrophoreseeinheit der Firma Biorad mit vertikalen Minigelen (8 x 12 cm) durchgeführt, deren Sammel- (pH 6,8) bzw. Trenngele (pH 8,8) einen Polyacrylamidgehalt von 4 % bzw. 7,5 % enthielten. Für jeden neuen Ansatz wurden die Gele frisch gegossen. Hierzu wurde eine Sammelgel- / Trenngelmatrix aus Acrylamidlösung, Tris-HCl-Puffer und destilliertem H<sub>2</sub>O hergestellt und durch Hinzugeben der weiteren Komponenten (vgl. 3.2) unmittelbar vor dem Gießen der Gele zum Polymerisieren gebracht. Konnten die Gele nach vollständiger Auspolymerisierung in die Laufkammer eingespannt werden, wurden sie mit Laufpuffer x 1 überschichtet.

Die Proteinlysate und der Standard wurden entsprechend ihrer Konzentration mit SDS-Probenpuffer verdünnt, die Proben anschließend für fünf Minuten bei 95 °C unter leichtem Schütteln (450 - 500 rpm) gekocht (Eppendorf Heizblock + Schüttler), auf Eis abgekühlt und 30 Sekunden bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die einzelnen Geltaschen konnten dann mit den Proben bzw. dem Molekulargewichtsstandard sorgfältig befüllt werden. An jeweils zwei Gele wurde eine Spannung von 80 V angelegt, bis die Laufront der Proben nach ca. 20 Minuten die Grenze zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatten. Zur Separation des ErbB2- und ErbB4-Rezeptors wurde während des Laufs im Trenngel eine Spannung von 120 V angelegt. Die benötigte Laufzeit (ca. 3 - 4 Stunden) ergab sich aus dem molekularen Gewicht der untersuchten Peptide.

### **4.4.4 Transfer aufgetrennter Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot)**

Die derart aufgetrennten Proteine wurden nun für die weiterführende Analyse im Western Blot elektrophoretisch vom Trenngel auf eine Trägermembran (Polyvinylidendifluorid, PVDF) übertragen. Verwendet wurde hierzu die Semidry-Methode nach J. Kyhse-Andersen (1984) unter Einsatz der Western Blot Kammer der Firma Biometra (Göttingen)<sup>184</sup>. Experimentell äquilibrierte man das Trenngel, nach Abtrennen und Verwerfen des Sammelgels, zunächst für ca. fünf Minuten in Kathodenpuffer (vgl. 3.2). Die PVDF-Membran wurde parallel erst 10 Minuten in Methanol, dann 2 Minuten in destilliertes Wasser und darauf weitere 10 Minuten in Anodenpuffer II eingelegt. Zusätzlich wurden pro Gel je 2-3 Whatman-Filterpapiere kurz mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II bzw. Kathodenpuffer getränkt.

Diese Zwischenschichten wurden anschließend gemäß nachfolgendem Schema (vgl. Abb. 33) mit Trenngel und PVDF-Membran aufgeschichtet und zwischen zwei Elektrodenplatten luftblasenfrei gespannt.



**Abb. 33**  
Schematische Darstellung der Semi-Trocken-Blotting-Technik.  
[modifiziert nach Kyhse-Andersen<sup>184</sup>]

An die Blot-Apparatur wurde nun eine Spannung von 60 mA pro Gel ( $\approx 1 \text{ mA/cm}^2$ ) für eine Stunde angelegt und nach Ablauf der Zeit die Übertragung des Standards überprüft.

#### 4.4.5 Nachweis der Proteine durch Chemolumineszenz und densitometrische Quantifizierung

Der Proteinnachweis erfolgte als Chemolumineszenz-Reaktion. Zur Blockade aller unspezifischen Proteinbindungsstellen der PVDF-Membranen wurden diese in einer Vorreaktion über 120 Minuten in 5 %iger Milchpulverlösung abgesättigt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern (vgl. Tabelle 16), die jeweils spezifisch gegen das untersuchte Protein gerichtet waren, erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer. Als Ladungskontrolle und als Normierungsprotein diente jeweils  $\beta$ -Aktin.

<u>Primär Antikörper</u>	<u>Verdünnungsfaktor mit Blockierungspuffer</u>
1. mouse anti-human Her2/ErbB2, monoklonal	1:4000
2. rabbit anti-human Her4/ErbB4, monoklonal	1:1000
3. mouse anti-Estrogen-Receptor, monoklonal	1:6000
4. rabbit anti-human $\beta$ -Actin, polyklonal	1:4000

**Tab. 16** Übersicht über die eingesetzten Western Blot Antikörper.

Zur Entfernung nicht gebundenen Antikörpers wurde die Membran am Folgetag sechsmal für je 20 Minuten in ATP-Puffer gespült. Die Inkubation (60 Minuten, Raumtemperatur) mit den korrespondierenden sekundären Antikörpern diente der Einführung der konjugierten Meerrettich-Peroxidase (= horse raddish peroxidase), die enzymatisch die Antigen-Antikörper-Komplexe anregt und somit ihre photometrische Detektion ermöglicht. Abschließend schlossen sich wiederum mehrere Waschschrte mit APT-Puffer an, um störende Hintergrundfärbung, aufgrund nicht gebundenen sekundären Antikörpers, zu vermeiden.

Die weiteren Schritte zur Sichtbarmachung der Proteine wurden mit Hilfe der Enhanced Chemiluminescence (ECL) Methode und dem „enhanced chemiluminescence“-Kit der Firma Amersham nach Herstellerangaben durchgeführt.

Hierzu wurden die Membranen für 120 Sekunden mit einer Mischung aus ECL-Reagenz A und B überdeckt. Hierdurch wurde die HRP-katalysierte Oxidationsreaktion des enthaltenden Diacylhydrazid Luminol im alkalischen Milieu unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid gestartet. Diese chemische Reaktion hebt die hierbei übertragenen Elektronen in einen höheren energetischen Zustand, aus dem sie unter Freisetzung von Licht in ihren Grundzustand zurückfallen. Diese Chemolumineszenz kann schließlich analog in einer Dunkelkammer durch einen Röntgenfilm oder digital durch eine Spezialkamera, wie dem Luminescent Image Analyzer LAS 4000, erfasst und quantifiziert werden.



## 4.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Molekularbiologische Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit für folgende zwei Fragestellungen eingesetzt:

- I. Zur quantitativen Bestimmung des isoformspezifischen Her4-Expressionsniveau von epigenetisch veränderter Mammakarzinomzellen.
- II. Zum qualitativen Nachweis des  $Fc\gamma$ -Polymorphismus der verwendeten NK 3.3 Zellen.

### Allgemeine Vorbemerkungen zum Arbeiten mit RNA

Die Isolierung und Analyse von Ribonukleinsäure (RNA) ermöglicht als Genexpressionsanalyse Aussagen über den augenblicklichen Zustand der untersuchten Zellen, da RNA wie eine Momentaufnahme nur jene Gene repräsentiert, die zum Untersuchungszeitpunkt aktiviert sind und somit transkribiert werden.

Der Umgang mit RNA setzt hierfür eine besondere Sorgfalt, Präzision und Reinheit in der Versuchsdurchführung voraus, nicht zuletzt da sich RNA aufgrund der ausgesprochenen Hydrolyseempfindlichkeit sehr leicht zersetzt. So wurde zur Sicherstellung valider Ergebnisse bei sämtlichen molekularbiologischen Arbeiten auf einem RNase-freien und sauberen Arbeitsplatz geachtet und die Arbeitsschritte, sofern möglich, zügig auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt.

Die Sensitivität der nachfolgenden Methoden bedingt die große Anfälligkeit derselben. Insbesondere Cross-Kontaminationen galt es u. a. durch räumliche Trennung verschiedener Arbeitsschritte möglichst auszuschließen.

#### 4.5.1 Isolierung von Total-RNA aus Zellkultur mit dem RNeasy Mini Kit der Firma QIAGEN

Die Total-RNA Isolationsmethode der Firma QIAGEN [RNeasy technology] kombiniert die molekularbiologische Technik der spezifischen Bindungsfähigkeit von RNA an eine Silicamembran mit der Geschwindigkeit der Microspinttechnologie. Nach Zelldenaturierung und RNase-Inaktivierung, wird die RNA an die Membran gebunden, mit den mitgelieferten Puffern gewaschen und abschließend mit Elutionspuffern von der Spin-Säule eluiert.

### Herstellung der Zelllysate

Die Isolierung von Total-RNA aus Zellkulturen wurde gemäß Herstellerangaben bei Raumtemperatur durchgeführt und die extrahierte RNA auf Eis gekühlt.

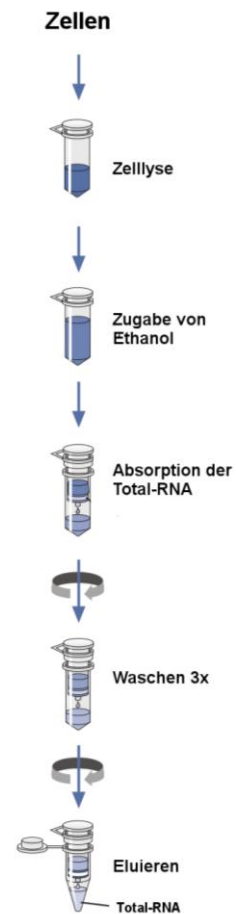
Hierzu wurden die zu untersuchenden Zellen - nach einmaligem Waschen mit PBS - durch Zugabe von Trypsin von den Kulturgefäßflaschen gelöst (vgl. auch Kap. 4.1.1.1). Nach Inaktivierung des Trypsins durch Verdünnen mit FCS-haltigem Kulturmedium, wurden die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen und nach einem Zählschritt  $1,5 \times 10^6$  Zellen unter kräftigen vortexen in 350 µl RLT-Puffer resuspendiert. Dieser stark Guanidiniumthiocyanat und  $\beta$ -Mercaptoethanol haltige Lysepuffer dient neben der Freisetzung der RNA auch der Inaktivierung der zellulären RNasen, um einen Abbau der RNA zu vermeiden.

Bis zur eigentlichen Isolierung der RNA wurden die Zelllyse bei -80 °C eingefroren.

### RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte gemäß den Herstellerangaben<sup>185</sup>.

1. Die Zelllysate wurden mit 350 µl 70 %-igen Ethanol vermischt und die gesamte Suspension auf eine RNeasy Mini-Säule überführt. Nach einer 15-sekündigen Zentrifugation mit  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000 \text{ rpm}$ ), währenddessen die RNA an der Silica-Membran absorbiert, wird die durchgetretene Flüssigkeit verworfen.
2. In einem folgenden Waschschrift wurden 350 µl RW1-Puffer auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000 \text{ rpm}$ ) zentrifugiert.
3. Um eine eventuelle Ergebnisbeeinflussung durch zelluläre DNA-Rückstände zu reduzieren, wurde anschließend 80 µl eines DNase-Puffers (27,3 kUnits DNase in RDD-Puffer) auf die Silicamembranen pipettiert und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert.
4. In einem zweiten Waschschrift wurden erneut je 350 µl QIAGEN RW1-Puffer auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000 \text{ rpm}$ ) zentrifugiert.
5. Der letzte Waschschrift erfolgte mit 500 µl QIAGEN RPE-Puffer und einer 15-sekündigen Zentrifugation bei  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000 \text{ rpm}$ ).
6. Zur vollständigen Trocknung der Silica-Membran von Ethanol wurde der vorhergehende Schritt mit einer Zentrifugationsdauer von 2 min wiederholt.
7. Nachdem die Säule auf ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gesetzt wurde, wurden 50 µl RNase-freies Wasser darauf gegeben und für 1 min bei  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000 \text{ rpm}$ ) zentrifugiert, um die absorbierte RNA möglichst vollständig von der Membran zu eluieren.
8. Das gewonnene RNA-Extrakt wurde auf Eis für die nachfolgenden Analysen gelagert.



**Abb. 34**  
**Fließschema der RNA-Isolation.** [modifiziert nach QIAGEN<sup>185</sup>]

#### 4.5.2 Quantitative und qualitative Analyse der isolierten RNA

Nukleinsäuren können spektralphotometrisch über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm quantitative und qualitative analysiert werden.

Hierbei lässt sich die Konzentration einer vorliegenden RNA-Probe über die Proportionalität der gemessenen Extinktion zu einer hochreinen RNA-Lösung berechnen. Diese besitzt bei einer Konzentration von 40 µg/ml und einer Wellenlänge von 260 nm eine optische Dichte (OD) von 1.

Zur Beurteilung der RNA-Reinheit eignet sich der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm. Hochreiner RNA entspricht hierbei ein Extinktionsquotient ( $E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$ ) von 2,0. Eventuelle Verunreinigungen mit Proteinen verschieben diesen Quotient zu kleineren, eine DNA-Kontamination hingegen zu größeren Werten.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Nanodrop® Spektralphotometer (Thermo Fisher, USA) verwendet, das lediglich 1 µl der RNA-Lösung zur Extinktionsmessung benötigt. Als Referenzlösung zur internen Eichung des Geräts diente 1 µl reines Wasser ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ).

### 4.5.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ermöglicht, in Kombination mit der unter 4.5.4 beschriebenen LightCycler-Analyse, als hoch empfindliches Verfahren eine Untersuchung der zellulären Genexpression auf RNA-Ebene.

Zur Synthese der einzelsträngigen cDNA wurde das „Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Roche Diagnostics GmbH verwendet. Eine Besonderheit dieses Reaktionskits bildet die mitgelieferte reverse Transkriptase. Dieses in *E. coli* exprimierte, rekombinante Enzym besitzt sowohl eine RNA-abhängige (= reverse Transkription), als auch eine DNA-abhängige DNA-Polymerasefunktion und eine RNase H Aktivität. Als Primer für die cDNA-Synthese wurden kurze, hexanukleotid random-Primer verschiedener Sequenzen verwendet, die spezifisch an die Poly(A)-Sequenz der einzelsträngigen mRNA hybridisieren und an deren freien 3'-Ende der komplementäre cDNA-Strang entsteht<sup>186</sup>.

### Durchführung

Die Umschreibung von mRNA zu cDNA erfolgte gemäß Herstellerangaben. Hierzu wurde von jeder Probe 0,5 µg isolierte Total-RNA mit RNase-freiem Wasser zu einem Endvolumen von 5,5 µl gemischt. Zu diesen RNA-Lösungen wurden jeweils 1 µl hexanukleotid Random-Primer (60 µM) pipettiert und bei 65 °C für 5 Minuten im Thermocycler inkubiert. Dieser Erwärmungsschritt erfolgte, um mögliche sekundäre RNA-Strukturen zu denaturieren und somit eine erleichterte Bindung der Random-Primer zu ermöglichen. Nach Abkühlung der Proben auf Eis, wurde zu jedem Ansatz 3,5 µl Master-Mix gegeben, dessen Komponenten in folgender Tabelle aufgelistet sind.

<u>Eingesetzte Substanz</u>	<u>Volumina</u>
1. 5-fach RT Puffer (40 mM MgCl <sub>2</sub> )	2 µl
2. RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,25 µl
3. dNTPs (10 mM)	1 µl
4. Reverse Transkriptase (20 U/µl)	0,25 µl

Tab. 17 Zusammensetzung des cDNA-Synthese Mastermix.

Als Negativkontrollansätze, um falsch positive Amplifikate zu identifizieren, wurden zusätzlich jeweils ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (-RT-Ansatz) mitgeführt, zu dem anstelle des Enzyms H<sub>2</sub>O pipettiert wurde. Da im Rahmen der RNA-Isolation ein DNase I-Verdau durchgeführt wurde, sollte somit keine genomische DNA mehr in den Proben enthalten sein und somit nachfolgend kein PCR-Produkt liefern.

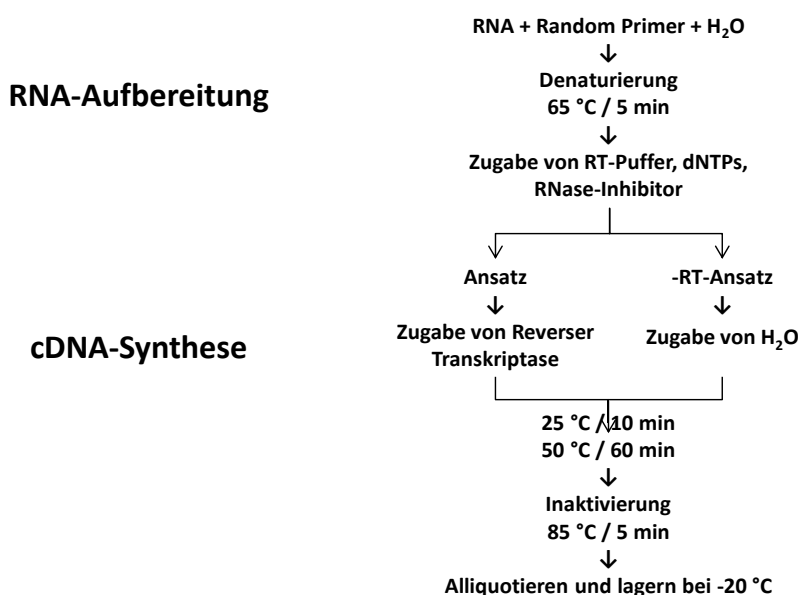


Abb. 35  
Übersicht über die  
Ablaufschritte der reversen  
Transkription der zellulären  
RNA in cDNA.  
[modifiziert nach Roche  
Diagnostics<sup>186</sup>]

Nach vorsichtigen Mischen der Substanzen und anzentrifugieren der PCR-Gefäße (8er-Strips), erfolgte die reverse Transkription im Thermocycler nach folgenden Inkubationsschema:

- 25 °C für 10 Min.
- 50 °C für 60 Min. (Synthese der cDNA)
- 85 °C für 5 Min. (Inaktivierung der reversen Transkriptase)

Die Reaktion wurde durch Überführen der Proben auf Eis gestoppt und nach 1:5-Verdünnung und Aliquotierung direkt für die nachfolgende PCR eingesetzt oder bis zum späterem Gebrauch bei -20 °C tiefgefroren.

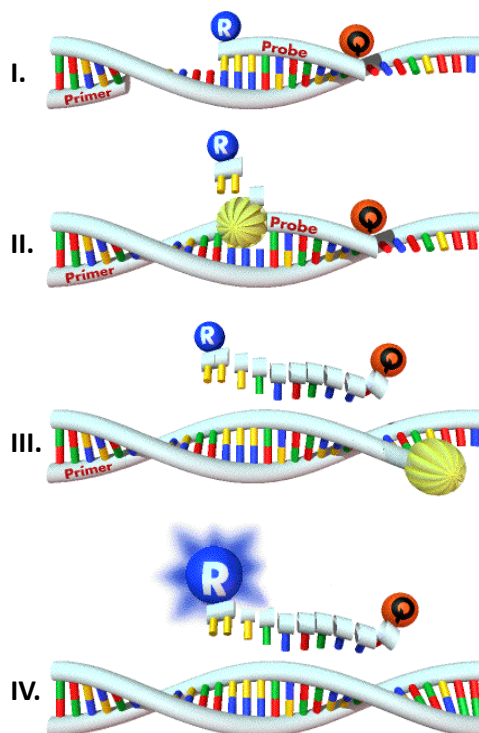
#### 4.5.4 Relativquantitative Real-Time PCR mit dem Light Cycler

Eine real-time PCR basiert auf dem Prinzip einer konventionellen PCR, wobei die DNA-Amplifikation in Echtzeit überwacht und die entstandene Transkriptmenge kinetisch, (semi-)quantitativ erfasst werden kann.

Die Kombination eines Thermocycler und eines Fluorometers in einem einzigen Gerät, als sogenannter LightCycler® wurde erstmals 1998 von der Firma Roche (Mannheim) vorgestellt. Die Grundlage hierfür lieferte 1992 Higushi et al., die erstmals eine kinetische Echtzeitanalyse einer PCR-Reaktion unter Zugabe Ethidiumbromid beschrieben<sup>187</sup>. Durch diese Verknüpfung der Amplifikations- und der Detektionseinheit gelang es die äußerst zeit- und arbeitsaufwändigen Schritte einer Genanalyse zu automatisieren und damit Reproduzierbarkeit und Sensitivität weiter zu steigern.

Die RNA-Quantifizierung erfolgt hierbei über den Vergleich des PCR-Signals eines Zielgens in verschiedenen Proben, indem sein Expressionsniveau im Verhältnis zu dem eines Referenzgens (sog. Housekeeping-Gen), das in jeder Zelle ubiquitär und homogen exprimiert wird, normalisiert wird. Ein in jeder Messung mitgeführter endogener Standard, z. B. aus einem Gemisch bekannter, das zielgenexpressimierender Zellen, ermöglicht abschließend die Korrelation zwischen verschiedenen Untersuchungen.

Zur Detektion des synthetisierten PCR-Produktes wurden in der vorliegenden Arbeit sog. TaqMan-Sonden bzw. Hydrolyse-Sonden eingesetzt, deren Funktionsprinzip in Abb. 36 zusammengefasst wird.



**Abb. 36**  
Übersicht über das Funktionsprinzip der TaqMan-Sonden und der Taq-DNA-Polymerase. [entnommen aus Schild et al.<sup>188</sup>]

- I. Spezifische Anlagerung der Sonde und der PCR-Primer. Aufgrund der räumlichen Nähe der beiden Fluoreszenzfarbstoffen wird die Fluoreszenz des Reporter-Fluorophors (R) durch den Quencher (Q) mittels eines Fluoreszenz-Energietransfers (FRET) unterdrückt.
- II. Primer-Extension und Sondenhydrolyse durch die kombinierte Polymerase- und 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase.
- III. PCR-Produkt wird vollständig synthetisiert, die Farbstoffe getrennt.
- IV. Die freigesetzte Menge der Reportermoleküle korreliert mit dem Reporter-Signal, da nun seine Fluoreszenz nicht mehr durch den Quencher gehemmt wird.

Bei diesem Hybridisierungsverfahren lagern sich die beidseits fluoreszenzgekoppelten TaqMan-Sonden als Oligonukleotide zwischen den basenspezifischen Primer an die cDNA-Templates. Während des kombinierten

Annealing/Extensionschrittes kommt es schließlich durch die zusätzliche 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase (Taq = *Thermus aquaticus*) zur Spaltung und Freisetzung der Sonden und hierbei zu einer Zunahme des zumessenden Fluoreszenzsignals.

Physikalisch begründet sich die veränderte Fluoreszenzstärke auf den von Theodor Förster im Jahr 1948 beschriebenen Fluoreszenz-Energietransfer (= FRET). Denn während es in der angelagerten Konfiguration der Sonde - aufgrund der räumlicher Nähe - zu einem FRET vom Farbstoff am 5' Ende der Sonde (Reporter, R) auf den Quencher (Q) am 3' Ende und damit zu einer Erhöhung des Fluoreszenzsignal des Quenchers im Vergleich zu einem alleinigen Fluoreszenzmolekül kam, entfällt dieser Effekt mit der Hydrolyse der TaqMan-Sonde. Mit der konsekutiven Entlagerung der beiden Farbstoffe voneinander, bedingt der nun fehlende FRET eine Verstärkung des Reportersignals und eine Abnahme desselben des Quenchers.

Vor diesem Hintergrund korreliert schließlich die Stärke des Reporter-Fluoreszenzsignals mit den Zyklen der PCR, da dessen freie Menge proportional mit dem entstandenen PCR-Produkt zunimmt.

#### 4.5.4.1 Durchführung

Die semiquantitative Real-time PCR zur isoformspezifischen Her4-Quantifizierung wurde mit dem Light Cycler (LC) 480 der Firma Roche Diagnostics durchgeführt. Die Sonden- und Primer-Auswahl für die Her4 Isoform-spezifische PCR orientierte sich an dem von Junttila et al. publizierten PCR-Design<sup>189</sup>.

<b>ErbB4 JMa</b>	Forward-primer	5'-CCA CCC ATC CCA TCC AAA-3'
	Reverse-primer	5'-CCA ATT ACT CCA GCT GCA ATC A-3'
	Probe = Sonde	5'-Fam-ATG GAC GGG CAA TTC CAC TTT ACC A-Dabcyl-3'
<b>ErbB4 CYT2</b>	Forward-primer	5'-CAA CAT CCC ACC TCC CAT CTA TAC-3'
	Reverse-primer	5'-ACA CTC CTT GTT CAG CAG CAA A-3'
	Probe = Sonde	5'-Fam-AAT TGA CTC GAA TAG GAA CCA GTT TGT ATA CCG AGA T-Dabcyl-3'

**Tab. 18 Überblick über die verwendeten Isoform-spezifischen Her4-Primer und Hybridisierungssonden.**

Zur relativen Quantifizierung diente  $\beta$ -Actin als sog. Housekeeping Gen. Die verwendeten Primer sind in Tab. 19 zusammengefasst, wobei die eingesetzte Variante nach der Länge des Primers der nachzuweisenden Her4-Isoform ausgewählt wurde, um derart eine möglichst hohe Übereinstimmung zu gewährleisten.

<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	Forward 1	5'-GGA GCA CCC CGT GCT GC-3'
	Reverse 1	5'-GCG TAC AGG GAT AGC ACA GCC-3'
	Forward 2	5'-CCT GAA CCC CAA GGC CAA CC-3'
	Reverse 2	5'-GTG GTA CGG CCA GAG GCG-3'
	Forward 3	5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT-3'
	Reverse 3	5'-CCG TCA CCG GAG TCC ATC A-3'
	Probe	5'-LCRed-610-TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA CCT TCA ACA C-BHQ-2-3'

**Tab. 19 Überblick über die verwendeten  $\beta$ -Actin Primer und Hybridisierungssonden. Insgesamt wurden jeweils drei verschiedene Forward- und Reverse-Primer zur Quantifizierung des Housekeeping-Gen verwendet, um möglichst hohe Übereinstimmung mit der Länge der Primer der jeweiligen Isoform-Variante des Her4-Gens zu garantieren.**

Als TaqMan-Sonden wurden Hybridisierungssonden der Firma Metabion eingesetzt, wobei deren Basenfolge ebenfalls in den Tabellen 18 und 19 aufgeführt sind. Fam (= 6-Carboxyfluorescein) diente bei den Sonden zur isoformspezifischen Her4-Detektion als Reporterfluorochrom, während LC Red an das 5'-Ende der  $\beta$ -Aktin-

Sonden konjugiert war. Als Quencher-Farbstoffe wurden zudem am 3'-Ende Dabcyl (= 4-((4-(Dimethylamino)phenyl)azo) Benzoessäure) bzw. BHQ-2 eingesetzt.

Als Referenz zwischen den unabhängigen Wiederholungsexperimenten wurde jeweils ein Kalibrierungsstandard aus verschiedenen Her4<sup>+</sup>-Zelllinien (u. a. ZR.75.1, MCF7, T47D) mitgeführt. Zudem diente dieser Bezugspunkt, wie die jeweils dreifache Amplifikation jeder Probe der Ergebnisvalidierung.

Weiterhin wurde für jede Messung ein gemeinsamer Mastermix (vgl. Tab. 20) vorbereitet, der alle notwendigen Reagenzien inklusive Primern und Sonden, allerdings ohne das jeweilige Template (= cDNA) enthielt, um derart Pipettierungsungenauigkeiten möglichst auszuschließen.

<u>Eingesetzte Substanz</u>	<u>Volumina</u>
1. LC480 Probes Master = gepufferte Elektrolytlösung mit den Nukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dUTP) sowie den notwendigen Enzyme (u. a. Taq-Polymerase)	5,0 µl
2. FAM bzw. LC-Red-markierte Taqman-Sonde = 0,75 µl anti-Her4-Isoform Probe + 0,75 µl anti-β-Actin-Probe	1,5 µl
3. Forward- und Reverse-Primer = 0,5 µl anti-Her4-Isoform Primer + 0,5 µl anti-β-actin Primer	1.0 µl

Tab. 20 Zusammensetzung des PCR-Mastermix.

In leere 96-Well-Plates wurde nun pro Vertiefung 2,5 µl Template, also entweder cDNA (1:5 verdünnt), Standard/Kalibrator oder als Leerwert hochreines Wasser, als Matrize vorgelegt. Als interne Kontrolle der vorausgegangenen Reversentranskriptase-Reaktion wurden zusätzlich Ansätze ohne Enzym mitgeführt, um eine ggf. vorhandene Kontamination mit anderer DNA nachzuweisen bzw. auszuschließen.

Anschließend wurden jeweils 7,5 µl des obigen Mastermix hinzugegeben, die 96-Well-Plates kurz an zentrifugiert und die real-Time PCR an einem Light Cycler (LC) 480 der Firma Roche Diagnostics gestartet. Zur Aktivierung der DNA Taq-Polymerase war den PCR-Zyklen eine 10-minütige Vorinkubation bei 95 °C vorgeschaltet.

Die qRT-PCR selbst bestand aus 45 Amplifikationszyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt (15 Sek. bei 95 °C) und einem kombinierten Anlagerungs- und Verlängerungsschritt (60 Sek. bei 60 °C). Die abschließende Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit Hilfe der LightCycler® 480 Software der Firma Roche Diagnostics.

#### 4.5.5 Nested-PCR zur Isotype-Bestimmung des Fcγ-Rezeptors

Die sog. „nested-PCR“ (verschachtelte PCR) ermöglicht die Spezifität einer Polymerase-Kettenreaktion um den Faktor  $10^2$  -  $10^3$  weiter zu erhöhen, indem sie nach einer ersten Amplifikation das entstandenen PCR-Produktes für eine weitere PCR als Template verwendet.

Zum Einsatz kommen bei dieser Methode zwei unterschiedliche Primer-Paare, wobei die der nachgeschalteten Reaktion auf dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt weiter innen als die ersten beiden Primer binden (vgl. Abb. 37). Auf diese Weise werden in der zweiten PCR alle unspezifischen PCR-Produkte der ersten Reaktion ausgesiekt und lediglich der zu untersuchende DNA-Abschnitt amplifiziert<sup>190</sup>.

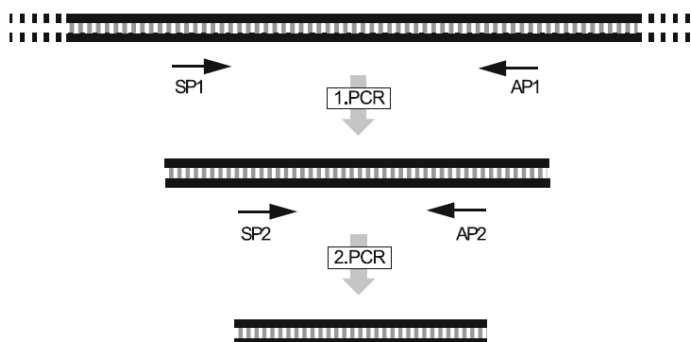


Abb. 37 Prinzip der „nested“ PCR. Die Bindungsstellung der Primer der zweiten Reaktion (SP2 und AP2) liegen hierbei innerhalb des in der ersten Reaktion amplifizierten PCR-Produkts.

[entnommen aus Müllhardt et al.<sup>190</sup>]

#### 4.5.5.1 Durchführung

Vor Bestimmung des vorliegenden  $Fc\gamma$ -Rezeptor-Polymorphismus in den NK 3.3 Zellen wurde die genomische DNA mithilfe des RNeasy Mini Kits der Firma QIAGEN entsprechend der Herstelleranweisungen isoliert und bei -20 °C gelagert (vgl. Kap. 4.5.1).

Die Genotypisierung von  $Fc\gamma$ RIIIA (158F/V) erfolgte als zweischrittige „nested“ PCR mit nachfolgender allelspezifischer Restriktionsanalyse, deren erste PCR ein 1366bp großes Fragment amplifiziert.

Die eingesetzten allelspezifischen Primer sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst.

<b>Fcγ RIIIA</b>	PCR 1	forward / sense	A013: 5'-ATA TTT ACA GAA TGG CAC <b>C</b> AGG-3'
		reverse / antisense	A012: 5'-GAC TTG GTA CCC AGG <b>T</b> TG AA-3'
Die <b>rot</b> markierten Basen wurden als Mismatches zur Vergrößerung der Spezifität eingefügt.			
<b>Fcγ RIIIA</b>	PCR 2	forward / sense	A014: 5'-atc aga ttc gAT CCT ACT TCT GCA GGG GGC AT-3'
		reverse / antisense	A016: 5'-acg tgc tga gCT TGA GTG ATG GTG ATG TTC AC-3'
Der sense Primer enthält einen Mismatch, der eine NlaIII Restriktionsstelle lediglich in die FcγRIIIA-158V-kodierende DNA einfügt. Großgeschriebene Basen entsprechen hybridisierbaren Nukleotiden, während die kleingeschrieben für nicht-annelierende Basen stehen.			

**Tab. 21 Übersicht über die eingesetzten Primer.** [modifiziert nach Koene et al.<sup>191</sup> und Haas et al.<sup>192</sup>]

Für den Pipettieransatz der ersten PCR wurden 2,5 ng Template [1 µl einer 2,5 ng/µl genomische DNA-Lösung], je 75 ng Primer [1,25 µl einer 10 µM-Stocklösung], 12,5 µl GoTaq Green Master Mix [mit der GoTaq® DNA Polymerase, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP sowie 3 mM MgCl<sub>2</sub> in einer gepufferten Reaktionslösung (pH 8.5)] mit 9,0 µl H<sub>2</sub>O auf Eis zu einem Gesamtvolumen von 25 µl gemischt. Zur Ergebnisvalidierung wurden zusätzlich Reagenzkontrollen mitgeführt.

Die erste PCR umfasste insgesamt 35 Zyklen (Denaturierung: 1 Min. bei 95 °C; Primerhybridisierung 90 Sek. bei 56 °C; Extension 90 Sek. bei 72 °C), wobei diesen eine 10 Min. Denaturierung bei 95 °C zur Auflösung vorhandener sekundärer DNA-Strukturen vorangestellt wurde. Die finale Elongation fand für 8 Min. bei 72 °C statt.

Für die zweite allelspezifische PCR wurde 0,5 µl des Produktes der ersten PCR, je 75 ng Primer [1,25 µl einer 10 µM-Stocklösung], 12,5 µl GoTaq Green Master Mix [mit der GoTaq® DNA Polymerase, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dCTP, 400 µM dTTP sowie 3 mM MgCl<sub>2</sub> in einer gepufferten Reaktionslösung (pH 8.5)] mit 9,5 µl H<sub>2</sub>O auf Eis zu einem Reaktionsvolumen von 25 µl gemischt. Zur Ergebnisvalidierung wurden erneut zusätzlich Reagenzkontrollen mitgeführt.

Diese zweite PCR umfasste ebenfalls 35 Zyklen (Denaturierung: 1 Min. bei 95 °C; Primerhybridisierung 60 Sek. bei 64 °C; Extension 60 Sek. bei 72 °C), wobei diesen ein etwas kürzerer Denaturierungsschritt über 5 Min. bei 95 °C zur Auflösung vorhandener sekundärer DNA-Strukturen vorausgestellt wurde. Die finale Elongation fand für 9,5 Min. bei 72 °C statt.

Für den Restriktionsenzymverdau mit NlaIII, bei dem die zugegebene Endonuklease das entstandene 94-bp DNA-Fragment nach einer CATG-Basensequenz am 3'-Ende spaltet, wurde folgender Mastermix auf Eis pipettiert und im Anschluss für 5 Min. bei 37 °C inkubiert.

- 17 µl H<sub>2</sub>O
- 2 µl fast digest Puffer
- 10 µl PCR-Produkt aus PCR 3

- 1 µl Fast Digest NlaIII

Die endgültige Polymorphismusanalyse unter UV-Licht erfolgt nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben (jeweils 15 µl) über ein 5 %iges Agarosegel (ca. 90 Min.; 100 V) und Anfärbung mit GelRed™. Als Detektionsstandard wurde der DNA Ladder (Ultra Low Range) der Firma Fermentas / Thermo Fisher verwendet.

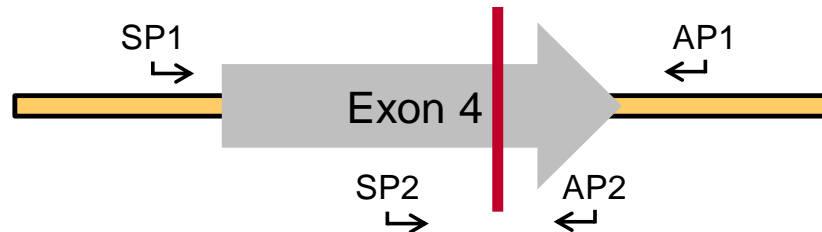


Abb. 38 Graphische Darstellung der Genomposition des 158F/V- Polymorphismus (rote Linie) innerhalb 4. Exons des FcγRIIIA-Gens sowie die Angriffspunkte der verwendeten Primer. [eigene Graphik]

#### 4.6 ECHT-ZEIT-ZELLANALYSE MIT DEM xCELLIGENCE-SYSTEM (RTCA = REAL-TIME CELL ANALYZER)

Das von der Firma Roche entwickelte xCelligence-System basiert auf der Erstbeschreibung eines RT-CES (real time cell electronic sensing) Assays durch I. Giaever und C. R. Keese aus dem Jahr 1984 und ermöglicht die dynamische Verfolgung phänotypischer Veränderungen von in vitro Zellkulturen<sup>193</sup>. Auf diese Weise können in Echtzeit zelluläre Prozesse, wie die Proliferation, das Zellwachstum, die Zellmigration sowie der Adhäsionsgrad verfolgt werden. Darüber hinaus ermöglicht dieses Verfahren quantitative Aussagen zur zytotoxischen Wirkung oder Apoptoseinduktion untersuchter Substanzen auf Zellen<sup>194</sup>.

Das Messprinzip dieses Verfahrens beruht auf der elektrischen Auswertung von Impedanzänderungen. Diese Wechselstromwiderstände werden durch adhären-wachsende Zellen über die isolierenden und kapazitiven Eigenschaften ihrer Plasmamembranen derart beeinflusst, dass es mit zunehmender Zellzahl und verstärkter Adhärenz zu einem Anstieg der Impedanz kommt<sup>194</sup>. Die zu untersuchenden Tumorzellen werden hierzu auf sog. E-Platten kultiviert, deren Vertiefungen in ihrer Größe klassischen 96-Well Mikrotiterplatten gleichen, nur dass auf ihrem Boden eine Vielzahl von Goldfilm-Elektroden aufgebracht sind. Über einen RTCA Analyzer erfolgt schließlich die quantitative Bestimmung des Widerstands und dessen kontinuierliche Übermittlung an eine Kontrolleinheit. Diese berechnet nun für jedes einzelne Untersuchungswell über den zeitlichen Verlauf aus der Impedanz-Veränderung gemäß der nachfolgenden Formel 2 einen dimensionslosen, relativen Zellindex (Cell Index, CI).

$$CI_i = \frac{(R_{tn} - R_{t0})}{F_i} \text{ mit } i = 1, 2 \text{ oder } 3 \text{ sowie } F_i = \begin{matrix} F_1 = 15 \, \Omega \text{ bei } 10 \, \text{kHz} \\ F_2 = 12 \, \Omega \text{ bei } 25 \, \text{kHz} \\ F_3 = 10 \, \Omega \text{ bei } 50 \, \text{kHz} \end{matrix}$$

Formel 2 Berechnungsformel des dimensionslosen Zellindex (Cell Index, CI), wobei  $R_{t0}$  der Hintergrundimpedanz des reinen Kulturmediums zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $R_{tn}$  dem gemessenen Widerstand zum Zeitpunkt  $t_n$  entspricht.

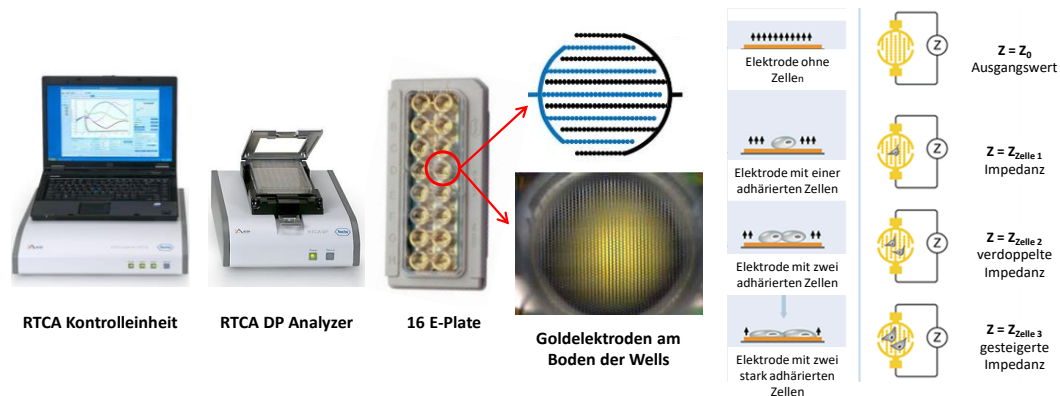
Dieser CI korreliert mit dem Zellstatus. Somit ergibt sich ein CI von annähernd 0, wenn keine Zellen in der Vertiefung vorhanden oder diese nicht am Plattenboden adhären. Mit der Zellzahl, ihrer Morphologie sowie dem Grad der Anhaftung steigt der Zellindex.

In Abb. 39 wird der Aufbau und das Messprinzip des xCelligence zusammengefasst.

Der herausragende Vorteil dieser Methodik gegenüber den klassischen Endpunktassays liegt neben der Möglichkeit Zellantworten kontinuierlich bis zu mehreren Tagen zu verfolgen, darin, dass diese



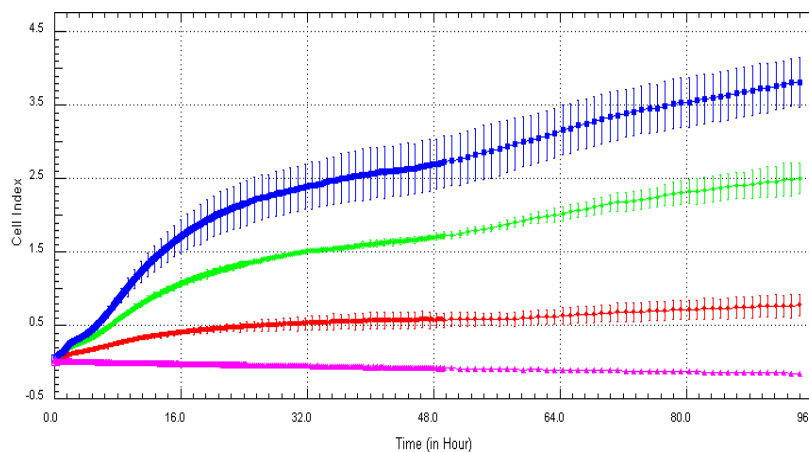
Untersuchungstechnik nicht auf eine radioaktive, immunologische oder sonstige Markierung der Zielzellen angewiesen ist<sup>194</sup>.



**Abb. 39 xCelligence-System der Firma Roche Diagnostics.** Als Ausgangswert mit einem Cell Index CI = 0 wird der reine Einfluss des Kulturmediums auf die Impedanz definiert. Adhären von Zellen auf die im Boden eingelassenen Elektroden steigt mit der Zellzahl und dem Adhäsionsgrad der elektrische Widerstand und somit der CI. [Modifiziert nach Roche Diagnostics<sup>195</sup> und Acebio<sup>196</sup>]

### Erstellung zelllinienspezifischer Wachstumskurven

Zur Etablierung eines markierungsfreien Echtzeitapoptoseassays mittels des xCelligence-Systems wurden in einem ersten Schritt Untersuchungen zur Dynamik des Zellwachstums und der Adhäsion der in der vorliegenden Promotionsarbeit verwendeten Zelllinien (BT-474, BT-474<sub>Res</sub>, JIMT-1, ZR-75.1, T47D, MCF7 und NK 3.3) durchgeführt. Diese Vorversuche zeigten eine streng positive Korrelation zwischen der ausgesäten Zellzahl und den gemessenen Cell-Indizes und ermöglichten die Auswahl der geeigneten Zellzahl für die eigentlichen ADCC-Cokulturen. In Abb. 40 werden stellvertretend die Ergebnisse für die Zelllinien BT-474 und NK 3.3 dargestellt.



**Abb. 40a**  
**xCelligence-Etablierung.**  
Dynamische Analyse der Zellproliferation und Adhäsion von BT-474 Zellen über einen Zeitraum von 96h.  
15.000 Zellen/Well [blau];  
10.000 Zellen/Well [grün];  
5.000 Zellen/Well [rot];  
Kulturmedium [rosa].

Zur Korrelation und Validierung obiger Ergebnisse wurden die E-Plates am Versuchsende nativ mikroskopisch untersucht und fotodokumentiert.

Die Impedanz-Analysen der Suspensionszelllinie NK 3.3 (vgl. Abb. 40b) bestätigen, dass ledig adhären wachsende Zelle messbare Veränderungen des elektrischen Widerstandes verursachen. Somit kann geschlussfolgert werden, dass trotz hoher NK-Zellzahlen in den nachfolgenden Cokulturanalysen sämtliche gemessenen Cell-Indizes auf den Veränderungen der Mammakarzinomzellen beruhen und nicht durch die NK-Zellen beeinflusst werden.

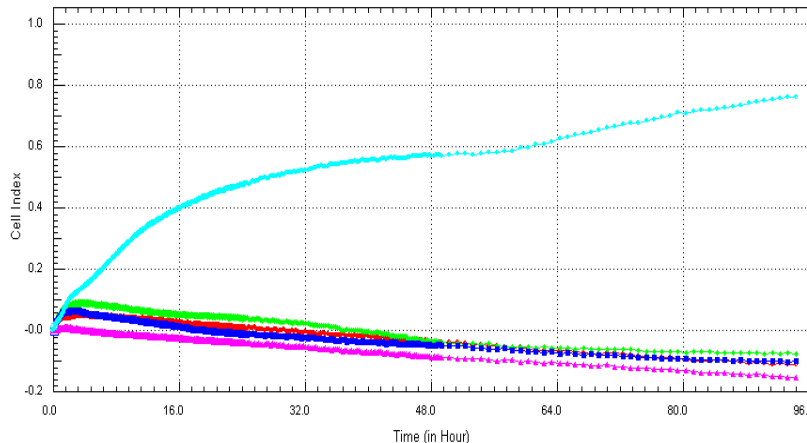


Abb. 40b

**xCelligence-Etablierung.**

Dynamische Analyse der Zellproliferation und Adhäsion von natürlichen Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 über einen Zeitraum von 96h.

15.000 Zellen/Well [blau];

10.000 Zellen/Well [grün];

5.000 Zellen/Well [rot];

Kontrollzelllinie BT-474 mit

5.000 Zellen/Well [türkis];

Kulturmedium [rosa].

Das Messprotokoll zur Erstellung dieser Wachstumskurven war nach Äquilibrieren, Hintergrundmessung und Aussaat der Zellen folgendermaßen aufgebaut: In den ersten 6 Stunden wurde der Zellindex alle 60 Sekunden dokumentiert, um Effekte in der anfänglichen Adhäsionsphase möglichst vollständig zu erfassen. Danach erfolgte bis zum 96-stündigen Versuchsende alle 5 Minuten eine Messung.

**Vitalitätsbestimmung mit dem xCelligence-System**

Das xCelligence-System verfolgt kontinuierlich den Zellstatus der adhärennten Targetzellen in Cokulturen und ermöglicht auf diese Weise die Apoptoseinduktion in Tumorzellen durch natürliche Killerzellen im Sinne einer ADCC-Reaktion in Echtzeit zu verfolgen. Die zellbiologische Grundlage dieser Vitalitätsmessungen beruht darauf, dass sich absterbende Zellen pathophysiologisch verändern. Sie ziehen sich zusammen, verändern ihre Morphologie und verlieren mit der Schädigung ihres Zytoskeletts sowie ihrer Oberflächenrezeptoren ihren Adhäsionsgrad. Dies wird über das RT-CES System schließlich erfasst und als veränderter Zellindex dokumentiert<sup>197</sup>.

Während klassische in vitro Assays zur Untersuchung des immunologisch vermittelten Zelltodes sich der Bestimmung zytosolischer Substanzen (radioaktivmarkierte Ionen, Fluorochrome) bedienen, mit denen die Targetzellen vor Versuchsstart beladen wurden und die im Rahmen der Zellyse freigesetzt werden, ermöglicht das verwendete Verfahren eine vollständige Unabhängigkeit der möglicherweise interagierenden Markierungen<sup>197</sup>. Ein weiterer Vorteil gegenüber den klassischen Endpunktanalysen ist, dass auch bereits sehr frühe Phasen zeitlich aufgelöst detektiert werden können<sup>197</sup>.

Zur besseren Vergleichbarkeit unabhängiger Experimente und Elimination etwaiger interexperimenteller Schwankungen der Wachstumskurven wurden die ermittelten Cell-Indices auf den sog. Delta Cell Index ( $\Delta CI_{ti}$ ) gemäß Formel 3 normiert:

$$\Delta CI_{ti} = CI_{ti} + (\Delta CI_{reference} - \Delta CI_{Delta\ time}) \text{ mit } \Delta CI_{reference} = 1,0$$

**Formel 3 Berechnungsformel des dimensionslosen Delta Cell Index**, wobei sich dieser aus dem gemessenen Impedanzunterschied ( $CI_{ti}$ ) sowie einer normierenden Delta-Konstante für jedes Well berechnet. Letztere entspricht wiederum der Differenz eines Referenz  $\Delta CI$  und einem ermittelten Cellindex zu einem definierten Normierungszeitpunkt. In den vorliegenden RT CES-Vitalitätsassays war dies der Zeitpunkt des Behandlungsstartes.

Hierbei wurde als  $CI_{Delta\ time}$  der gemessene Cell Index zum Zeitpunkt des Behandlungsstartes, also mit Zugabe der Effektorzellen und der Antikörper definiert.

**Durchführung**

Zur Kalibrierung der E-Plate 16 wurde initial 100  $\mu$ l NK-Zellmedium in jedes Well pipettiert und die Mikrotiterplatten für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter einer Sterilbank äquilibriert, ehe die Hintergrundmessung zur Ermittlung des Ausgangszellindex  $R_{t0}$  gestartet wurde. Im Anschluss wurden in weiteren 100  $\mu$ l Nährlösung die Targetzellen in die Vertiefungen gegeben. Die jeweilige Zellzahl wurde in

Vorversuchen in Abhängigkeit der zellulären Charakteristika, wie der Größe, der Morphologie bzw. den Proliferationseigenschaften der Zellen ermittelt. In Tab. 22 werden die eingesetzten Zellzahlen pro Well aufgeführt.

<u>Zelllinie</u>	<u>Eingesetzte Zellzahl pro Well</u>
1. BT-474 <sub>Wildtyp</sub>	12.500 Zellen
2. BT-474 <sub>Resistent</sub>	12.500 Zellen
3. ZR-75.1	15.000 Zellen
4. T47D	8000 Zellen
5. MCF7	8000 Zellen

**Tab. 22 Zusammenstellung der eingesetzten Zellzahlen pro Well im ADCC-xCelligence Assay.**

Nach der Aussaat der Mammakarzinomzellen in maximal 14 der 16 Wells, die beiden Übrigen dienten als Negativkontrolle, wurden die E-Plattes nach einer Wartezeit von ca. 10 Minuten zurück im RT-CES Analyzer arretiert und die Messung gestartet. In den ersten 90 Minuten wurde der Zellindex alle 30 Sekunden gemessen, um Effekte der Adhäsionsphase möglichst vollständig zu erfassen. Während der weiteren 24- bis 48-stündigen Kultivierung unter Brutschrankbedingungen wurde das Messintervall auf 2,5 Minuten erweitert, bis die Targetzellen schließlich die stationäre Wachstumsphase erreichten. Zu diesem Zeitpunkt wurden nun vorsichtig jeweils 100 µl aus jedem Well entfernt und durch eine Suspension aus NK 3.3 Zellen und therapeutischen Antikörpern ersetzt, sodass sich eine Target- / Effektorzell-Ratio von 1 : 1 ergab. Als monoklonale Antikörper kamen Trastuzumab, Pertuzumab und mAb1479 in verschiedenen Konzentrationen zum Einsatz.

Die ADCC-Reaktion in den Cokultur-Ansätzen wurde daraufhin über weitere 48 Stunden über Impedanzanalysen verfolgt. In den ersten 6 Stunden wurde hierzu alle 90 Sekunden eine Messung durchgeführt und danach das Messintervall bis zum Ende des Experimentes auf 15 Minuten erweitert. Sämtliche Ansätze wurden als Duplikate durchgeführt. Entsprechende Negativkontrollen wurden stets mitgeführt. Hierzu diente neben einem Well, das lediglich Kulturmedium enthielt, eine weitere Vertiefung, die nur mit Effektorzellen bestückt wurde, die als Suspensionszelllinie ebenfalls den CI nicht beeinflusste.

## 4.7 MIKROSKOPISCH-HISTOLOGISCHE VERFAHREN

### 4.7.1 Giemsa-Färbungen von ADCC-Zellkulturen

Die Giemsa-Färbungen der ADCC-Cokulturen wurden als korrelierendes Verfahren zu den Impedanz-Analysen des xCelligence-Systems (vgl. Kapitel 4.6) durchgeführt, da sie eine direkte mikroskopisch Bewertung der Apoptoseinduktion in den Targetzellen durch die Effektorzellen ermöglicht.

#### Zellkultur in Chamber-Slide-Zellkulturplatten

Die ADCC-Cokulturen für die Giemsa-Färbung wurden in „ChamberSlides“ angesetzt. In diesen Zellkulturgefäßen, die aus einem beschichteten Objektträger und mehreren darauf angebrachten (abnehmbaren) Kammern (vgl. Abb. 41) bestehen, wurden an Tag 0 jeweils 25.000 BT-474 Zellen pro Well in insg. 0,5 ml Kulturlösung ausgesät. Nach einer Anwachsphase von 48 h erfolgte an Tag 2 ein Mediumwechsel sowie die Zugabe der NK 3.3 Zellen (jeweils 25.000 Zellen/Well) und des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab. Die 24-stündige Cokultivierung wurde an Tag 3 mit der Zellfixierung und -färbung beendet.

Die mikroskopische Beurteilung erfolgte an den in Tab. 23 aufgeführten Kulturen.



**Abb. 41 Chamber-Slide Zellkulturgefäß.**  
[entnommen von ibidi.com<sup>198</sup>]

<b><u>Ansätze</u></b>		
1.	BT-474	(Negativkontrolle)
2.	BT-474 + Trastuzumab (10 µg/ml)	
3.	BT-474 + NK 3.3	
4.	BT-474 + NK 3.3 + Trastuzumab (10 µg/ml)	
5.	BT-474 + NK 3.3 + Trastuzumab (2,5 µg/ml)	
6.	BT-474 + NK 3.3 + Trastuzumab (0,5 µg/ml)	
7.	BT-474 + NK 3.3 + Trastuzumab (0,1 µg/ml)	
8.	BT-474 + NK 3.3 + NaN <sub>3</sub>	(Positivkontrolle)

Tab. 23 Übersicht über die Giemsa gefärbten (Co-)Ansätze.

**Färbung**

Die Schritte der Giemsa-Färbung inklusive vorausgehender Fixierung mit Formalin werden in der nachfolgenden Übersicht dargestellt:

<b><u>Arbeitsschritt</u></b>	<b><u>Reagenz</u></b>	<b><u>Zeit</u></b>
1. Absaugen des Kulturmediums		
2. Waschen der adhärenen Zellen	PBS [kalt; 0,5 ml]	
3. Zellfixierung	4 % Formalin [RT; 0,5 ml]	15 Min.
4. 2 x Waschen der adhärenen Zellen	PBS [RT; 0,5 ml]	je 2 Min.
5. Waschen der adhärenen Zellen	Aqua dest. [RT; 0,5 ml]	2 Min.
6. Zellfärbung	Giemsa-Arbeitslösung [RT; 0,5 ml]	30 Min.
7. Differenzierung der Färbung	1 % Essigsäure [RT; 0,5 ml]	15 Sek.
8. 2 x Dehydrieren des Schnittes	96 % Ethanol	je 10 Sek.
9. 2 x Dehydrieren des Schnittes	100 % Propanol	je 10 Sek.
10. 2 x Dehydrieren des Schnittes	Xylol	je 2 Min.
11. Eindeckeln der Schnitte	Entellan	

Tab. 24 Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte zur Giemsa-Färbungen von ADCC-Zellkulturen.

Die im Ergebnisteil der vorliegenden Arbeit abgebildeten mikroskopischen Aufnahmen der Giemsa-gefärbten (Co-)Kulturen wurden unter 40-facher mikroskopischer Vergrößerung erstellt.

**4.7.2 Immunfluoreszenz****Theoretische Grundlagen**

Das Grundprinzip der Immunfluoreszenz ähnelt dem des Western Blots (vgl. 4.4.4). Mit Hilfe spezifischer Fluoreszenzsonden, die meist an einen sekundären Antikörper gekoppelt sind, werden das Ausmaß und die subzelluläre oder histologische Verteilung der zu untersuchenden Gewebestrukturen in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch direkt Fluorochrom-gekoppelte primäre Antikörper eingesetzt. Auf diese Weise konnte die spezifische Colokalisation während der ADCC-Reaktion bzw. die Annäherung der mobilen Effektorzellen an die adhärenen Targetzellen visualisiert werden. Experimentell wurden die fixierten Mammarkarzinomzellen spezifisch mit einem anti-Her2-Antikörper und die natürlichen Killerzellen mittels eines anti-NKp46 Antikörpers markiert. Aufgrund der unterschiedlichen Markierung der beiden Antikörper (FITC und APC) konnten sie individuell sichtbar gemacht und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Als Kernfarbstoff wurde parallel DAPI eingesetzt.

### Durchführung

Die vorbereitende ADCC-Cokultivierung in Chamber-Slide-Zellkulturplatten glich der unter 4.2.3.3 beschriebenen Form, nur dass die Effektor-Target-Zell-Interaktion bereits nach 12 h beendet wurde. Die eingesetzten Primärantikörper sind in Kapitel 3.2 aufgeführt.

Die Schritte der Immunfluoreszenz-Färbung inklusive vorausgehender Fixierung mit Formalin werden in der nachfolgenden Übersicht dargestellt:

<u>Arbeitsschritt</u>	<u>Reagenz</u>	<u>Zeit</u>
1. Absaugen des Kulturmediums		
2. Waschen der adhärenen Zellen	PBS [kalt, 0,5 ml]	
3. Zellfixierung	4 % Paraformaldehyd [RT, 0,5 ml]	15 Min.
4. 3 x Waschen der adhärenen Zellen	PBS [RT, 0,5 ml]	je 5 Min.
5. Blockade unspezifischer Bindungen	Bindungspuffer <sup>1</sup> [RT, 120 µl]	60 Min.
6. Primäre Antikörper-Reaktion	primäre AK in Dilutionbuffer <sup>2</sup> [4 °C, dunkel, 120 µl]	über Nacht
7. 3 x Waschen der adhärenen Zellen	PBS [RT, 0,5 ml]	je 5 Min.
8. Entfernung des Kammersystems		
9. 5 x Waschen der gefärbten Schnitte	PBS	je 5 Min.
10. Waschen der gefärbten Schnitte	Aqua dest.	30 Sek.
11. Trocknen der gefärbten Schnitte		
12. Eindeckeln der Schnitte	Vectashield + DAPI	

**Tab. 25 Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte zur Immunfluoreszenz-Färbungen von ADCC-Zellkulturen.**

Zur Ergebnisvalidierung wurden im Rahmen der Etablierung Einzelfärbungen erstellt und bei jeder Immunfluoreszenzfärbung als Negativkontrolle Ansätze ohne Primärantikörper mitgeführt.

### Mikroskopie der immunfluoreszenz-gefärbten ADCC-Zellkulturen

Zum Mikroskopieren der gefärbten Zellen und für die entsprechenden Photographien wurde das AxioImager Z1 Mehrkanal-Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss (Jena) mit der Software Axiovision (Zeiss, Göttingen) verwendet. Alle Aufnahmen wurden unter einer 40-fachen Vergrößerung mit einer schwarzweiß-CCD-Kamera (AxioCam MRm) erstellt und im Anschluss digital fusioniert.

Zur Mikroskopie von Her2 wurde ein Bandpass-Filter (535/30) sowie eine Anregungswellenlänge von 500 nm ( $\pm 20$  nm) zur Detektion des Flurochroms FITC verwendet. Der NK-Zellrezeptor NKp46 wurde mittels eines CY5-Filters (Flurochrom: APC; Anregung: 620/20 nm, Emission: 700/75 nm) fotografiert. Zur Zellkernbeurteilung wurde zusätzlich der DNA-interkalierende Farbstoff DAPI (Bandpass-Filter (535/30); Anregung: 365 nm) eingesetzt.

Auf den so entstandenen Bildern leuchtet somit Her2 grün und Nkp46 violett, während die Zellkerne mit blauen Signalen zu sehen waren.

<sup>1</sup> **Bindungspuffer** = PBS + 5 % normal goat serum + 0,3 % Triton X-100

<sup>2</sup> **Dilutionbuffer** = PBS + 1 % BSA + 0,3 % Triton X-100

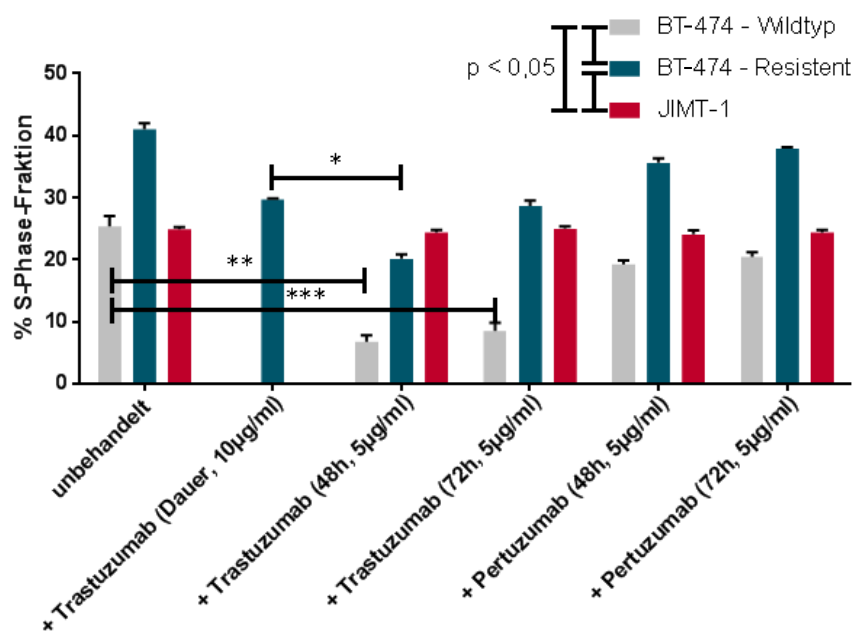
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 DIREKTES ANTI-HER2 TARGETING VON MAMMAKARZINOMZELLEN

Zielgerichtete Therapeutika beim Mammakarzinom, insbesondere die beiden monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab, fanden in der vergangenen Dekade breiten Einzug in die klinische Therapie des Her2<sup>+</sup>-Mammakarzinoms. Die zugrunde liegenden Mechanismen und das mögliche Ausmaß eines anti-Her2 Targetings sollen anhand der folgenden Untersuchungen aufgezeigt werden.

#### 5.1.1 Einfluss eines anti-Her2 Targetings auf die Zellproliferation

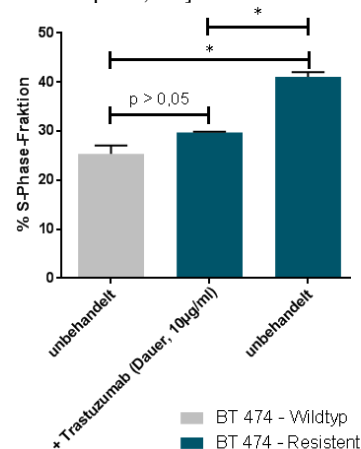
Die gemessenen S-Phase-Fractionen (SPF) der untersuchten Her2<sup>+</sup>-Zelllinien BT-474<sub>Wildtyp</sub>, BT-474<sub>Resistent</sub> sowie JIMT-1 werden in Abb. 42 dargestellt. Letztere sind als intrinsisch trastuzumabresistent vorbeschrieben. Die Daten repräsentieren die Absolutwerte am Tag der Zellernte nach 48- bzw. 72-stündiger Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin®) bzw. Pertuzumab (Perjeta®).



**Abb. 42**  
FACS S-Phase-Assay zur Untersuchung des direkten Trastuzumab- und Pertuzumab-Einflusses auf die Her2<sup>+</sup>-Zelllinien BT-474<sub>WT</sub>, BT-474<sub>Res</sub> und JIMT-1. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Kontrollen wurden im Tukey's multiple comparisons Test aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet. Bei den BT-474 Zellen mit erworbener Resistenz diente als Berechnungsgrundlage jeweils eine Probe unter Trastuzumab-Dauertherapie. Aus der Graphik sind die Standardfehler des Mittelwertes (Standard Error of the Mean; SEM) als Fehlerbalken zu entnehmen. [\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ]

Die Untersuchungen zur Trastuzumabbehandlung ergeben für die Wildtypzellen der Zelllinie **BT-474<sub>WT</sub>** immer einen hochsignifikanten Abfall der S-Phase-Fraktion ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ). Hier reduziert sich der Anteil der Zellen in der S-Phase von 25,3 % ( $\pm 1,70$  %) nach 48 Stunden auf 6,7 % ( $\pm 1,03$  %) bzw. nach 72 Stunden auf 8,5 % ( $\pm 1,32$  %). Die Zugabe von Pertuzumab hingegen bewirkt zwar einen absoluten Rückgang der proliferierenden Zellen, jedoch in einem nicht statistisch signifikanten Ausmaß.

Die Effekte für die Zelllinie **BT-474<sub>Res</sub>** mit der erworbenen Trastuzumab-Resistenz fallen demgegenüber wesentlich geringer aus. Während diese Zellen unter Trastuzumab-Dauertherapie statistisch eine vergleichbare SPF zu unbehandelten BT-474<sub>WT</sub> aufweisen (25,3 % ( $\pm 1,70$  %) [BT-474<sub>WT</sub>] vs. 29,7 % ( $\pm 0,19$  %) [BT-474<sub>Res</sub>]), proliferieren sie in reinem Kulturmedium mit einem SPF von 41,0 % ( $\pm 0,95$  %) signifikant schneller (vgl. Diagramm 43). Werden BT-474<sub>Res</sub> Zellen nach einer dreitägigen Anwachsphase über 48 Stunden mit Trastuzumab versetzt, ergibt



**Abb. 43**  
S-Phase-Assay zur Untersuchung der Proliferationskinetik von BT-474<sub>WT</sub> Zellen gegenüber ihren trastuzumabresistenten Klonen. [\*  $p < 0,05$ ]

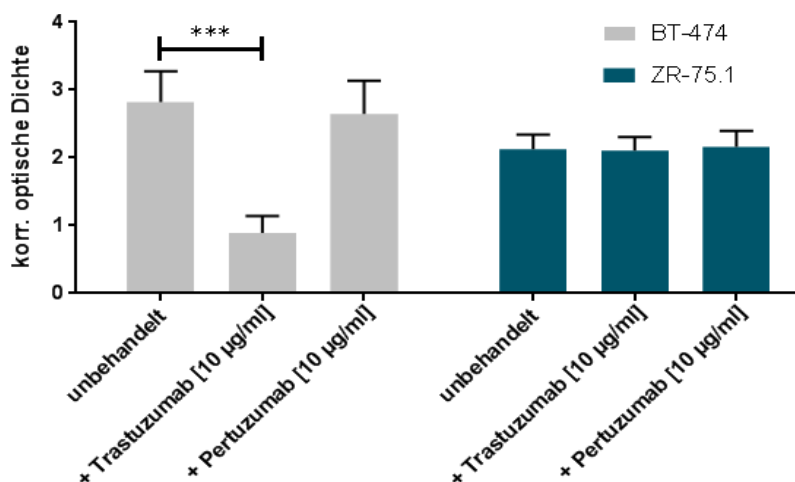
sich eine signifikante Proliferationsreduktion. Hier beträgt die SPF 20,1 % ( $\pm 0,70$  %). Bei einer 72-stündigen Therapie lässt sich mit 28,6 % ( $\pm 0,89$  %) jedoch kein signifikanter Einfluss des Antikörpers mehr nachweisen. Die Applikation von Pertuzumab bewirkt, bezogen auf das Wachstum in reinem Kulturmedium, erneut keine Hemmung des Zellwachstums. Der signifikante Unterschied im Vergleich zu den resistenten Zellen unter Trastuzumab-Dauertherapie ist eher auf den fehlenden Effekt des Herceptins zurückzuführen.

Sowohl die Trastuzumab- als auch die Pertuzumab-Therapie der **JIMT-1-Zellen** ergibt für alle untersuchten Zeiträume keinerlei signifikante Ergebnisse, was die intrinsisch Resistenz dieser Mammakarzinomzellen unterstreicht.

In der Two-way ANOVA berechnet sich zwischen den drei Zelllinien ein hoch signifikanter Unterschied.

### 5.1.2 Einfluss eines anti-Her2 Targetings auf den Zellmetabolismus

Nachdem im vorhergehenden Kapitel der direkte Einfluss eines anti-Her2-Targeting auf die Proliferation untersucht wurde, sollen diese Daten nun um die in vitro Ergebnisse zu seinem Einfluss auf den Zellmetabolismus ergänzt werden. Hierzu wurden Experimente mit dem Cell Proliferation Kit II (XTT) der Firma Roche® durchgeführt und diese zur Sicherstellung der Versuchsvalidität sowohl mit verschiedenen Zellzahlen (3000, 4500 und 6000 Zellen pro Well) als auch zu verschiedenen Endpunktzeiten (4 und 7 Tage) ausgemessen. Der genaue Versuchsablauf sowie die theoretischen Grundlagen sind unter Kapitel 4.3 beschrieben. In Diagramm 44 werden stellvertretend die Ergebnisse nach einer 7-tägigen Antikörperbehandlung mit einer Zellzahl von je 6000 Zellen/Well dargestellt. Eingesetzt wurden die Her2<sup>+</sup>-Zelllinie BT-474 sowie die Her4<sup>+</sup>- und nur schwach Her2<sup>+</sup>-Zelllinie ZR-75.1.



**Abb. 44**

**XTT-Assay zur Analyse des direkten Trastuzumab- und Pertuzumab-Effekte auf den Zellmetabolismus der Zelllinie BT-474 [Her2<sup>high</sup>] und ZR-75.1 [Her2<sup>dim</sup>].**

Repräsentativ für die untersuchten Versuchsmodalitäten werden hier die Ergebnisse zu den Versuchen mit einer Zellzahl von je 6000 Zellen/Well und am maximalen Endpunkt von 6 Stunden dargestellt. Die aufgetragene optische Dichte entspricht dem jeweiligen Mittelwert der Differenzen aus dem photometrischen Messwert und der Absorbanz einer Kulturmediumkontrolle. Die berechneten Standardfehler (= SEM) der drei unabhängigen Versuche sind als Fehlerbalken zu entnehmen.

[\*\*\* p < 0,001]

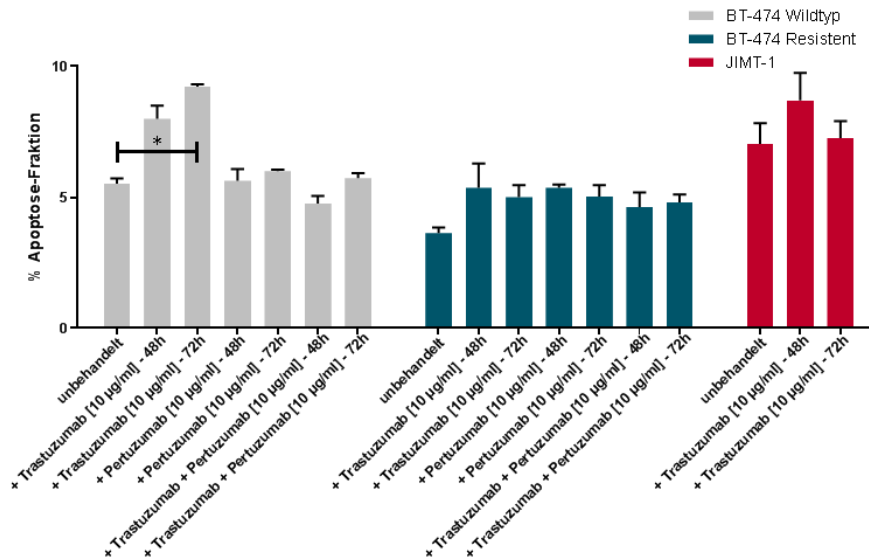
Die Sensitivität von BT-474 gegenüber Trastuzumab bestätigte sich auch bzgl. des Zellmetabolismus. So konnte eine signifikante Reduktion des Zellstoffwechsels von 2,82 ( $\pm 0,45$ ) auf 0,89 ( $\pm 0,24$ ) unter Herceptin-Therapie photometrisch bestimmt werden ( $p < 0,001$ ). Die Zugabe von Pertuzumab führt zwar absolut zu einer gering niedrigeren Umsetzung des XTTs, diese ergab vor dem Hintergrund des ausgeprägten SEM jedoch keine Signifikanz. Demgegenüber wies bei ZR-75.1 Zellen weder Trastuzumab noch Pertuzumab einen inhibitorischen Effekt auf. Bereits der deskriptive Vergleich der gemessenen absoluten Absorbanzen der unbehandelten Zellen mit 2,13 ( $\pm 0,21$ ) mit denen nach Trastuzumab- bzw. Pertuzumabzugabe mit 2,10 ( $\pm 0,20$ ) bzw. 2,16 ( $\pm 0,23$ ) erbrachte keinen Unterschied.

Auf eine weiterführende detaillierte Darstellung der ebenso erhobenen Daten nach einer viertägigen Behandlung bzw. unter Variation der Zellzahlen wird hier verzichtet. Zusammenfassend bestätigten die gewonnenen Messwerte den Trend der obig dargelegten Ergebnisse.



### 5.1.3 Einfluss eines anti-Her2 Targetings auf die Zellvitalität

Zur Beurteilung des Potentials einer anti-Her2 gerichteten Antikörpertherapie bzgl. der Induktion von Apoptose oder Nekrose wurden in einem dritten Schritt durchflusszytometrische Annexin-V-FITC Messungen durchgeführt (vgl. Abb. 45). Erneut wurden die Her2<sup>+</sup>-Zelllinien BT-474<sub>WT</sub>, BT-474<sub>Res</sub> und JIMT-1 eingesetzt und über 48 bzw. 72 Stunden mit Trastuzumab, Pertuzumab oder einer Kombination beider Antikörper behandelt. Der theoretische Hintergrund sowie die genaue Versuchsbeschreibung wird in Kapitel 4.2.3 erläutert.



**Abb. 45**

**Annexin-Apoptose-Assay zur Charakterisierung des direkten therapeutischen Potentials von Trastuzumab und Pertuzumab auf Zellen der Zelllinien BT-474<sub>Wildtyp</sub>, BT-474<sub>Resistent</sub> und JIMT-1.**

Die eingesetzte Antikörperkonzentration betrug jeweils 10 µg/ml. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern (= SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 48 bzw. 72 Stunden nach Antikörperzugabe. Signifikante Unterschiede wurde im Tukey's multiple comparisons Test berechnet. [\* p < 0,05]

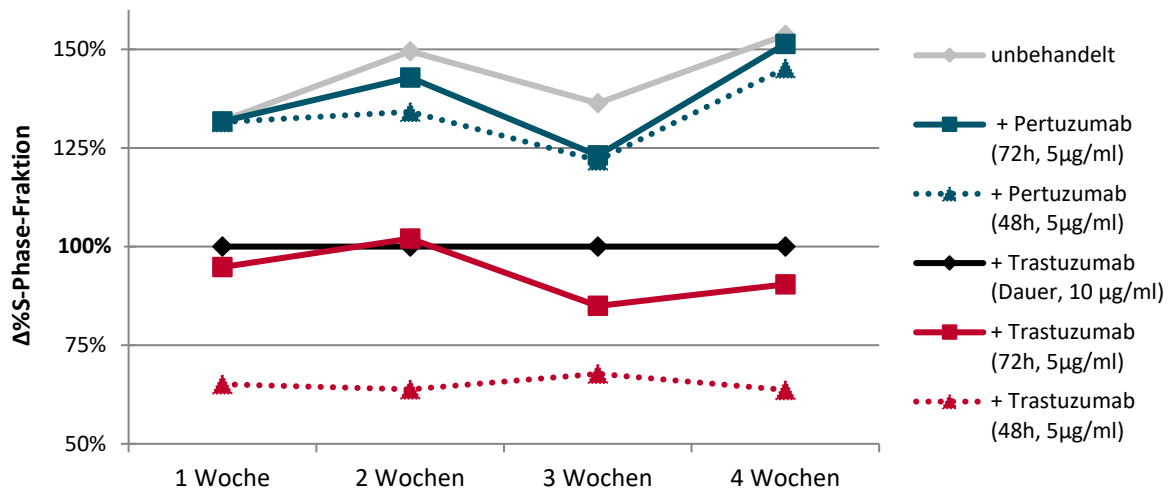
Die gemessenen Apoptosefraktionen der unbehandelten Kontrollen liegen mit 5,5 % ( $\pm 0,2$  %) bei BT-474<sub>WT</sub>, 3,6 % ( $\pm 0,2$  %) bei BT-474<sub>Res</sub> und 7,0 % ( $\pm 0,8$  %) bei JIMT-1 bei annähernd gleichen Werten und sind a. e. mit der Zellmanipulation im Rahmen des Behandlungs- und Färbeprotokolls zu erklären.

Die Zugabe des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab erhöht die Apoptosefraktion auf 8,0 % ( $\pm 0,5$  %) bzw. 9,2 % ( $\pm 0,1$  %) bei BT-474<sub>WT</sub>, auf 5,4 % ( $\pm 0,9$  %) bzw. 5,0 % ( $\pm 0,5$  %) bei BT-474<sub>Res</sub> und auf 8,7 % ( $\pm 1,1$  %) bzw. 7,3 % ( $\pm 0,6$  %) bei JIMT-1 nach einer 48- bzw. 72-stündigen Therapie. Statistisch ergibt sich hierbei in der One-way ANOVA Analyse lediglich bei BT-474<sub>WT</sub> Zellen und einer 72-stündigen Behandlung eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen ( $p < 0,05$ ). Wird den Zellen jedoch Pertuzumab bzw. eine Kombination zugegeben, führt dies hingegen zu keiner signifikanten Steigerung der Apoptosefraktion bzw. wird die Wirkung von einer reinen Trastuzumabbehandlung aufgehoben.



### 5.1.4 Charakterisierung der Stabilität der erworbenen Trastuzumab-Resistenz in BT-474<sub>Res</sub> Zellen

Wie unter 5.1.1 und 5.1.3 aufgezeigt, weisen BT-474<sub>Res</sub> Zellen eine erworbene Resistenz gegenüber dem therapeutischen Antikörper Trastuzumab auf. Nachfolgend soll die längerfristige Persistenz dieser veränderten Zelleigenschaften anhand von wiederholten durchflusszytometrischen SPF-Messungen dargelegt werden. Die Zellkulturbedingungen zur Etablierung dieser Zelllinienklone sind detailliert in Kapitel 3.1 beschrieben.



**Abb. 46 SPF-Assay zur Langzeitcharakterisierung der Trastuzumab-Resistenz von BT-474<sub>Res</sub> Zellen.** Zur Beurteilung der mehrwöchigen Persistenz dieser Zellveränderung wurden die resistenten BT-474 Zellen über insg. fünf Wochen in reinem Zellkulturmedium gehalten und wöchentlich mittels durchflusszytometrischen SPF-Assays auf ihre erworbene Widerstandsfähigkeit gegenüber Herceptin untersucht. Die Versuchsbedingungen glichen hierbei denen aus Kapitel 5.1.1. Der y-Achse ist die relative S-Phase-Fraktion unter der jeweiligen Behandlung im Verhältnis zur als 100% definierten SPF von resistenten BT-474 Zellen unter Trastuzumab-Dauertherapie zu entnehmen [ $\Delta\text{SPF} = \text{SPF}_{\text{BT-474-Res (Therapiebedingung)}} - \text{SPF}_{\text{BT-474-Res (Dauer-Therapie)}}$ ].

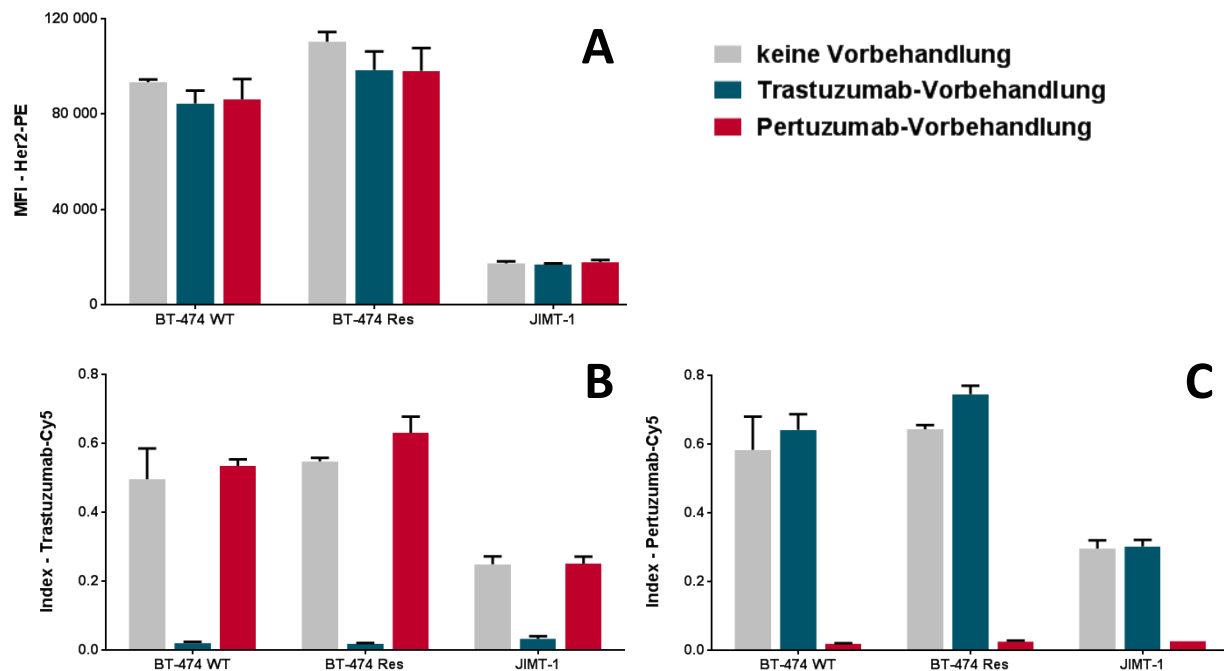
Zusammenfassend lassen sich die obig dargestellten Langzeitergebnisse als mindestens einmonatige Stabilität der erworbenen Trastuzumab-Resistenz interpretieren. Trotz leichter Schwankungen im zeitlichen Verlauf zeigten die BT-474<sub>Res</sub> Zellen auch nach vierwöchiger Proliferation ohne Trastuzumab (= unbehandelte Probe) vergleichbare Ergebnisse, wie am Start des Langzeitexperimentes. Hierbei führt der kurzfristige Entzug der Herceptindauertherapie zu einer Proliferationssteigerung, der durch die Applikation von Pertuzumab nicht aufgehoben werden kann. Nach diesem Antikörperentzug bewirkt die Zugabe von Trastuzumab über 48 Stunden hingegen eine kurzfristige Proliferationshemmung, ehe die Zellen nach drei Tagen erneut eine Resistenz aufweisen.

### 5.1.5 Trastuzumab- und Pertuzumab-Bindungskapazität

Das therapeutische Potential von Antikörpern fußt auf ihrer spezifischen Bindung an die entsprechenden Zielzellen. Erst diese Bindung ermöglicht sämtliche direkten (vgl. 5.1) und indirekten immunzellvermittelten Mechanismen (vgl. 5.2). Vor diesem Hintergrund wurde die Bindungskapazität von Trastuzumab und Pertuzumab an die in der Arbeit verwendeten Mammakarzinomzelllinien BT-474<sub>Wildtyp</sub>, BT-474<sub>Resistent</sub> und JIMT-1 untersucht. Da in den weiterführenden Cokultorexperimenten des Kapitels 5.2 neben dem anti-Her2 Targeting auch anti-Her2 Färbeantikörpern zum Einsatz kamen, wurde zudem eine mögliche Interaktion zwischen diesen FACS-Antikörpern und Trastuzumab bzw. Pertuzumab näher analysiert.

Die Abbildung 47A zeigt die mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) der anti-Her2-PE Färbung von unbehandelten [graue Balken] sowie mit 10 µg/ml Trastuzumab [blaue Balken] bzw. Pertuzumab [magenta Balken] behandelten Zellen. Die deutlich verschiedenen MFI-Werte zwischen den untersuchten Zelllinien bestätigen, das auf Proteinebene bekannte, unterschiedliche Her2-Expressionsniveaus zwischen BT-474 und JIMT-1 Zellen (vgl. Western Blot in Kapitel 3.1). So weisen BT-474<sub>WT</sub> bzw. BT-474<sub>Res</sub> mit 93347 ( $\pm 827$  SEM) bzw. 110370 ( $\pm 2942$  SEM) deutlich höhere MFI-Werte als die Her2<sup>dim</sup> Zelllinie JIMT-1 mit 17288 ( $\pm 629$  SEM) auf.

Des Weiteren beweisen die vorliegenden Daten, dass eine kurzzeitige Vorinkubation der Zellen mit Trastuzumab oder Pertuzumab keine signifikante Veränderung der MFI der anti-Her2-PE Färbungen bewirkt und damit keine sterische Hinderung des Detektionsantikörpers vorliegt (vgl. Abb. 47A).



**Abb. 47 Durchflusszytometrische Untersuchungen zum Her2-Gehalt sowie zur Trastuzumab- und Pertuzumab Bindungskapazität der Zelllinien BT-474<sub>WT</sub>, BT-474<sub>Res</sub> und JIMT-1.** Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf zwei unabhängige Experimentreihen.

**A:** Mittlere Fluoreszenzintensität einer anti-Her2-Pe Färbungen von unbehandelten (graue Balken) sowie über 30 Minuten mit 10 µg/ml Trastuzumab (blaue Balken) bzw. Pertuzumab (magenta Balken) behandelten Zellen.

**B und C:** Mittlere Fluoreszenzintensität einer Trastuzumab-Cy5 sowie der Pertuzumab-Cy5 Färbung.

In obiger Abbildung sind die Bindungskapazitäten von Trastuzumab-Cy5 (Abb. 47B) sowie Pertuzumab-Cy5 (Abb. 47C) als Index-Werte dargestellt. Die Normierung auf die MFI-Werte der anti-Her2-Pe Färbung erlaubt einen Vergleich über die drei untersuchten Zelllinien. Hierbei repräsentieren erneut die grauen Balken unbehandelte Zellen, während die blauen bzw. roten Balken Zellen darstellen, die zuvor für 30 Min. mit jeweils 10 µg/ml Trastuzumab bzw. Pertuzumab behandelt wurden.

Aus den gemessenen Daten lassen sich dreierlei Dinge postulieren. Zum einen sättigt die halbstündige Vorinkubation mit dem entsprechenden therapeutischen Antikörper sämtliche Epitope der Zielzellen ab, sodass der Färbeantikörper nur noch in minimalen Umfang binden kann. Entsprechend reduziert sich der Färbeindex in der entsprechend vorbehandelten Proben jeweils um mindestens 90 %. Zum anderen kommt es zu keiner störenden Interaktion der therapeutischen Antikörper untereinander. Trastuzumab bindet an Pertuzumab-vorbehandelte Zellen entsprechend wie an unbehandelte Zellen und umgekehrt. Zum Dritten kann aus obigem Diagramm geschlossen werden, dass die Resistenzentwicklung der BT-474<sub>Res</sub> Zellen nicht auf eine reduzierte Bindekapazität von Trastuzumab zurückzuführen ist. Für BT-474<sub>WT</sub> Zellen lässt sich ein Bindungsindex für Trastuzumab von  $0,582 \pm 0,068$  ermitteln, bei den resistenten Klonen beträgt er  $0,643 \pm 0,008$  (Kein Unterschied,  $p > 0,05$ ). Die JIMT-1-Zellen hingegen weisen einen deutlich reduzierten Bindungsindex für Trastuzumab und Pertuzumab im Vergleich zu BT-474 auf. Es scheint somit neben der bereits herausgerechneten reduzierten Her2-Expression, weitere Gründe für die Insensitivität dieser Zelllinie zu geben.

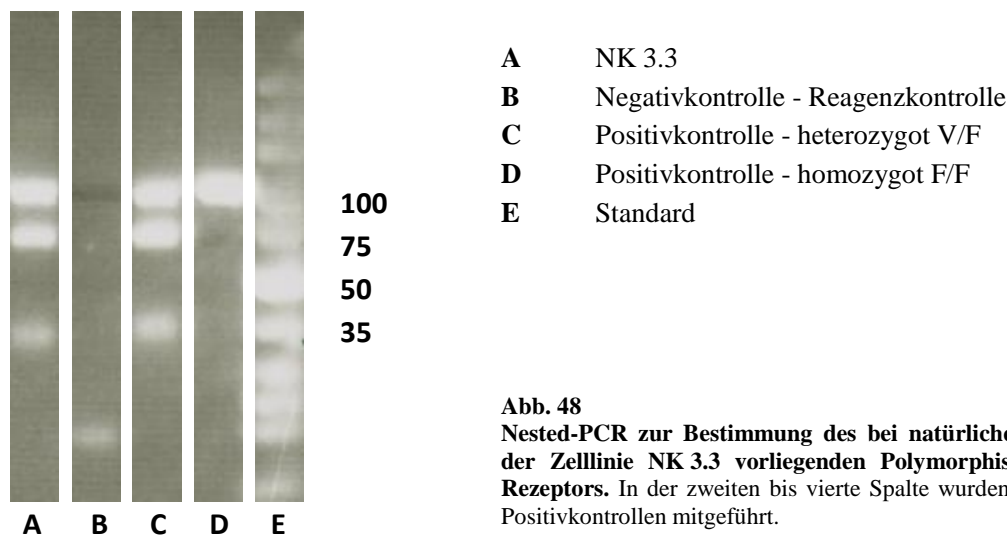
## 5.2 IMMUNOLOGISCHES POTENTIAL THERAPEUTISCHER ANTIKÖRPER

Neben den direkten zellulären Mechanismen beruht das therapeutische Potential zielgerichteter Antikörper in der Krebstherapie auch auf indirekten immunologisch vermittelten Wirkmechanismen.

### 5.2.1 Phänotypisierung der NK 3.3 Zellen

#### Charakterisierung des $Fc\gamma$ -Rezeptors (Polymorphismus-Bestimmung)

Aufgrund des unterschiedlichen Potentials der verschiedenen  $Fc\gamma$ -Rezeptorpolymorphismen immunologische Mechanismen zu initiieren<sup>191,192</sup>, wurden diesbezüglich die verwendete Effektorzelllinie NK 3.3 auf das Vorliegen des V- (hochaffine IgG-Bindung) bzw. F-Subtyps (niedrigaffine IgG-Bindung) evaluiert. Abbildung 48 zeigt eine repräsentative PCR-Aufnahme. Zur Validierung der Ergebnisse wurden sowohl Negativkontrollen (B), als auch bekannte hetero- und homozygote Genabschnitte des  $Fc\gamma$ -Rezeptors (C und D) mitgeführt. In der Auswertung der PCR-Daten zeigt sich eine heterozygote V/F Expression.

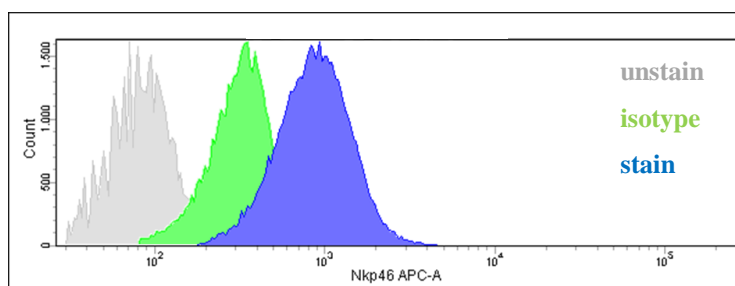


**Abb. 48**  
Nested-PCR zur Bestimmung des bei natürlichen Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 vorliegenden Polymorphismus des  $Fc\gamma$ -Rezeptors. In der zweiten bis vierte Spalte wurden Negativ- bzw. Positivkontrollen mitgeführt.

#### Charakterisierung des NK-Zellrezeptorenprofils

Die natürlichen Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 wurden hinsichtlich ihrer Expression von NKp46 als zentralen Differenzierungsmarker sowie auf ihre Oberflächenproteine CD56 und CD27 untersucht. Zudem wurden die  $Fc\gamma$ -Rezeptoren CD16, CD32 und CD64 analysiert. Zur Differenzierung gegenüber B- und T-Zellen wurden des Weiteren die Werte für CD3 und CD4 durchflusszytometrisch bestimmt.

#### NKp46, CD56, CD27, CD3 und CD4



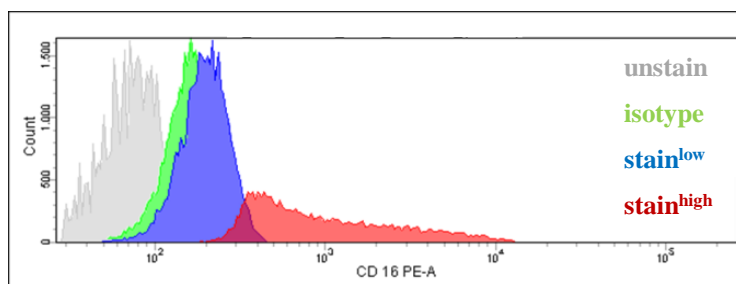
**Abb. 49**  
Durchflusszytometrische Bestimmung der APC-Fluoreszenzintensität einer NKp46-Färbung an NK 3.3 Zellen. In Grau sind die ungefärbten Zellen, in Grün die Isotype-Kontrollen und in Blau die gefärbten Zellen dargestellt.

In den durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen in reinen Monokulturen wiesen alle NK 3.3 Zellen in einer natürlichen Verteilung den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren NKp46 auf. Hierbei ergab sich eine mittlere APC-Fluoreszenzintensität von 963 ( $\pm$  507 SD) bei einem berechneten Stain-Index von 1,77 bzw. 9,90 bezogen auf die Isotype- bzw. ungefärbte Kontrolle.

Nach Begrenzung der Zellen auf die NKp46<sup>+</sup>-Population wurde der Expressionsstatus hinsichtlich der weiteren Oberflächenproteine ermittelt. Hierbei konnte definitionsgemäß sowohl das CD3-Antigen, als zentraler Bestandteil des T-Zell-Rezeptors (TCR), als auch CD4, das nicht nur von T-Zellen, sondern auch von B-Zellen, Makrophagen und Granulozyten exprimiert wird, nicht in den natürlichen Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 nachgewiesen werden. Lediglich 8,0 % der NKp46<sup>+</sup>-Zellen wiesen eine deutliche CD56-Expression, bei einer mittleren Pacific Blue-Fluoreszenzintensität von 267 ( $\pm$  281 SD) auf. Sämtliche Zellen waren darüber hinaus CD27<sup>-</sup>.

#### Fc $\gamma$ -Rezeptoren CD16, CD 32 und CD64

Zur Identifizierung pathogener Strukturen besitzen natürliche Killerzellen Fc $\gamma$ -Rezeptoren (vgl. Kapitel 1.3.2.1). Die drei wichtigsten Vertreter dieser Rezeptorenfamilie sind der CD16-, CD32- sowie der CD64-Rezeptor. Auch diesen durchflusszytometrischen Analysen wurde die Selektion der NKp46<sup>+</sup>-Population vorangestellt.



**Abb. 50**

#### **Durchflusszytometrische Bestimmung der PE-Fluoreszenzintensität einer CD16-Färbung an NK 3.3 Zellen.**

In Grau sind die ungefärbten Zellen, in Grün die Isotype-Kontrollen und in Blau bzw. Rot die gefärbten Zellen dargestellt, wobei als cut off Grenze zwischen den schwach bzw. stark positiven Populationen die Fluoreszenzintensität der Isotype-Kontrolle definiert wurde.

Zusammenfassend erscheint der CD16-Rezeptor als Hauptvertreter dieser Rezeptorenfamilie. Bei 35,3 % der Zellen ist er nachweisbar, wobei diese rezeptorpositive Population ein durchaus heterogenes Expressionsniveau aufweist [ $PE_{Mean} = 1656 (\pm 2055 \text{ SD})$ ]. Als Stain-Index für diese stark CD16 exprimierenden NK-Zellen ergibt sich bezogen auf den Isotype ein Wert von 7,37. Die beiden weiteren Fc $\gamma$ -Rezeptoren (CD32 bzw. CD64) konnten hingegen nicht signifikant nachgewiesen werden.

#### Charakterisierung des Rezeptorenprofils unter Stimulation der NK 3.3 Zellen

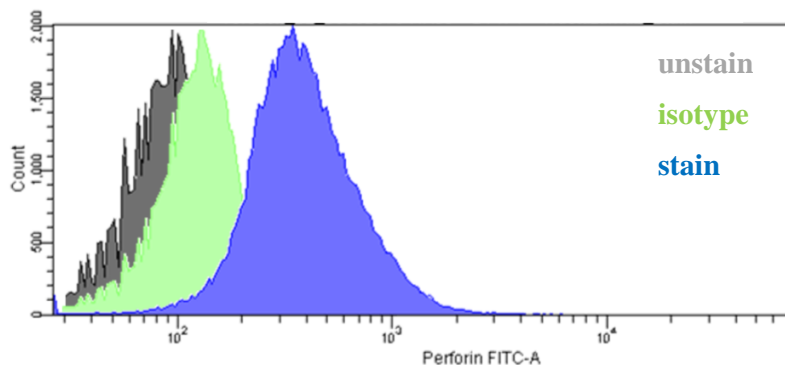
Ergänzend zu obigen Ergebnissen wurden die NK 3.3 Zellen auch in Cokultur mit Targetzellen (BT-474, ZR-75.1) sowie unter Zugabe von therapeutischen Antikörpern (Trastuzumab, Pertuzumab, mAb1479) phänotypisiert. Hierbei konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede unter diesen Bedingungen im Vergleich zur reinen NK 3.3 Zellkultur herausgearbeitet werden, sodass auf eine weiterführende detaillierte Darstellung an dieser Stelle verzichtet wird. Zurückzuführen scheint dies, a. e. auf den bereits aktivierten Zellstatus der NK 3.3 Zellen, da diese ja unter IL-2 Dauerstimulation (vgl. 3.1) kultiviert werden.

#### Intrazelluläre FACS-Messung von Perforin und INF- $\gamma$

Für die vorliegende Dissertation wurde ein FACS-Protokoll zur Ermittlung des intrazellulären Gehalts an Perforin und Interferon- $\gamma$  in NK 3.3 Zellen etabliert. Hierzu wurden die Fluoreszenzantikörper anti-Perforin-FITC und anti-Interferon- $\gamma$ -PE sowie ein weiterer APC konjugierter Antikörper zur Selektionierung der NKp46 positiven natürlichen Killerzellen eingesetzt. Insgesamt wurden die Effektor- und Targetzellen unter Hemmung des intrazellulären Vesikeltransports über 12 Stunden gemeinsam kultiviert, ehe die Zellen gefärbt und vermessen wurden.

Das FACS-Histogramm 51 zeigt eine exemplarische Messung an einer Cokultur aus BT-474 und NK 3.3 Zellen unter Zugabe des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab. Wie ersichtlich besitzen die natürlichen Killerzellen eine signifikante Perforinproduktion, wobei dieses Syntheseprofil nicht mit dem Aktivierungszustand der Zellen bzw. mit den Kulturbedingungen (Monokultur vs. Cokultur  $\pm$  Antikörper) korreliert. Auch in NK 3.3 Zellen aus Monokultur und ohne Zugabe von Antikörpern lässt sich Perforin nachweisen, was erneut

a. e. auf den IL2-bedingten aktivierten Zellstatus zurückzuführen ist. Die entsprechend ermittelten mittleren Fluoreszenzintensitäten [ $\text{FITC}_{\text{mean}} = 480 \pm 290 \text{ SD}$ ] sowie der Anteil der perforinpositiven Zellen bewegte sich jeweils in einem vergleichbaren Bereich.



**Abb. 51**  
FACS-Histogramm zur intrazellulären Produktion von Perforin in einer Cokultur aus BT-474 und NK 3.3 Zellen in Anwesenheit von Trastuzumab.

In Grau sind die ungefärbten Zellen, in Grün die Isotype-Kontrollen und in Blau gefärbten Zellen dargestellt.

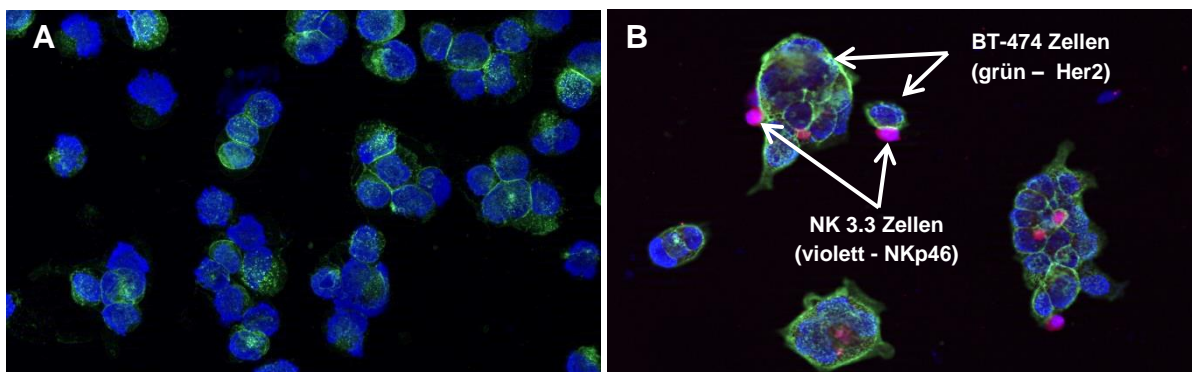
Eine IFN- $\gamma$  Sekretion der NK 3.3 konnte bei den hier durchgeführten Ansätzen jedoch nicht nachgewiesen werden.

### Immunfluoreszenzmikroskopie

Die unter 5.2 dargestellten Ergebnisse der xCelligence- bzw. FACS-Untersuchungen unterstreichen das Potential der zellimmunologisch vermittelten Mechanismen von Trastuzumab und Pertuzumab. Mittels der durchgeführten Immunfluoreszenzmikroskopie soll nun die zugrundeliegende zelluläre Interaktion zwischen den natürlichen Killerzellen als Effektorzellen mit den Mammakarzinomzellen visualisiert werden. Um die beiden Zellarten sicher differenzieren zu können, wurden zwei spezifische Fluoreszenz-markierte Antikörper eingesetzt. Die NK 3.3 Zellen wurden mit einem anti-NKp46-APC Antikörper markiert, während die BT-474 Zellen mittels eines FITC-konjugierten anti-Her2-Antikörpers detektiert wurden. Parallel wurde zudem eine Zellkernfärbung mit DAPI mitgeführt.

In Abbildung 52A ist die Mehrfachfärbung einer reinen BT-474 Monokultur dargestellt, die über 60 Stunden in Chamber-Slide-Zellkulturplatten kultiviert wurden. Hier bestätigt sich die hohe Her2-Expression (grün) auf der Zelloberfläche bei fehlendem Nachweis von Nkp46 (Violett).

Abbildung 52B zeigt exemplarisch eine 12-stündige Cokultur aus BT-474 und NK 3.3 Zellen nach Trastuzumabzugabe. Wie aus der mikroskopischen Aufnahme ersichtlich, kommt es im Rahmen der ADCC-Reaktion zu einer Annäherung der Effektorzellen an die Targetzellen. In der Folge führt diese Colokalisation zu Absterben und Abschwimmen der Mammakarzinomzellen.



**Abb. 52 Immunfluoreszenz:** **A:** Mikroskopische Darstellung einer reinen BT-474 Monokultur. In Grün wird mittels eines FITC-konjugierten anti-Her2-Antikörpers die hohe Expression dieses Wachstumsrezeptors auf der Zelloberfläche dargestellt. **B:** Mikroskopische Darstellung der antikörpervermittelten Colokalisation der natürlichen Killerzellen NK 3.3 (Effektorzellen) und der Mammakarzinomzellen BT-474 (Zielzellen). Die BT-474 Zellen sind erneut mit anti-Her2-FITC (Grün), die NK 3.3 Zellen mit anti-NKp46-APC (Violett) markiert. Die Zellkerne zusätzlich mit DAPI gefärbt.



### 5.2.2 xCelligence-Untersuchungen

Das xCelligence-System der Firma Roche ermöglicht markierungsfreie Echtzeitanalysen von Zelladhäsion bzw. -proliferation und ermöglicht dadurch Rückschlüsse auf die Apoptoseinduktion in Tumorzellen, die gemeinsam mit Effektorzellen kultiviert wurden. Im Folgenden wird jeweils eine repräsentative Untersuchung an den Her2<sup>+</sup>-Zelllinien BT-474<sub>WT</sub>, BT-474<sub>Res</sub> und JIMT-1 dargestellt, wobei mit den beiden Letzteren jeweils eine Zellart mit erworbener bzw. intrinsischer Trastuzumab-Resistenz vertreten ist. Alle Experimente wurden hierzu mindestens zweimal unabhängig voneinander wiederholt und erbrachten in der deskriptiven Auswertung vergleichbare Ergebnisse. Die Effektor-Targetzell-Ratio betrug jeweils 1:1, sofern kein anderes Verhältnis genannt ist.

#### BT-474<sub>WT</sub>

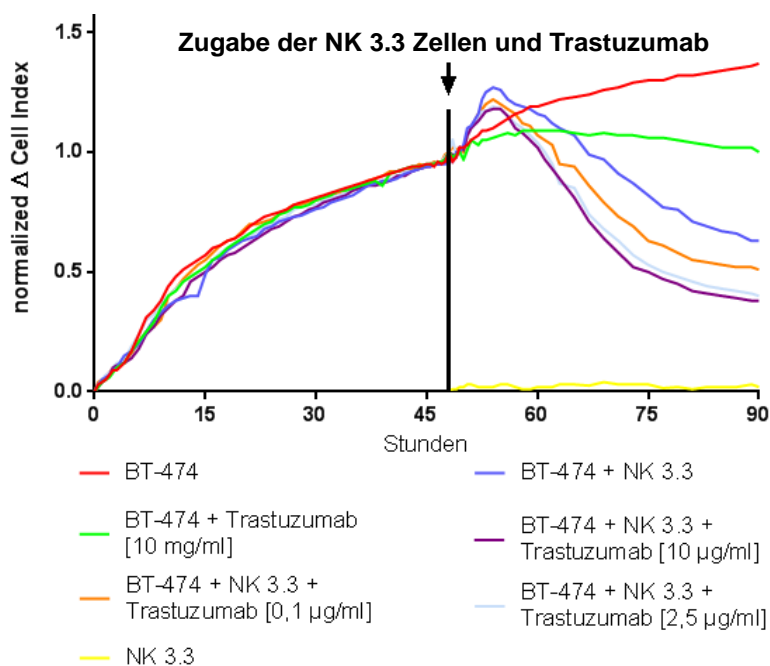


Abb. 53a

**xCelligence-Versuch zur kinetischen Analyse von ADCC-Cokulturen der Zielzelle BT-474 in An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3 und des monoklonalen anti-Her2-Antikörpers Trastuzumab.**

Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von mindestens zwei unabhängigen Wiederholungen. Die E:T-Ratio betrug jeweils 1:1 in den Cokulturen. Die einzelnen Versuchsansätze in den xCelligence-Diagrammen sind farbig codiert. Die roten Kurven geben die Ergebnisse der unbehandelten Monokulturen wieder. Eine Trastuzumab-Behandlung wird hellgrün dargestellt. Die Cokultur-Ergebnisse sind blau, violett, orange und hellblau gefärbt, wobei Erstere die reine Wirkung der NK 3.3 Zellen auf die Zielzellen beschreibt und die weiteren Verläufe die NK-zellvermittelte ADCC-Effekte in Anwesenheit von Trastuzumab repräsentieren. In Gelb ist ein NK 3.3 Ansatz eingezeichnet.

Insgesamt wurden die Kulturen über 90 Stunden im xCelligence-System verfolgt, wobei nach einer ca. zweitägigen Anwuchsphase die Cokultivierung, ggf. unter Zugabe der therapeutischen Antikörper, gestartet wurde. Dieser Zeitpunkt ist in sämtlichen Graphen (vgl. Abb. 53a, 54 und 55) als schwarzer senkrechter Balken markiert.

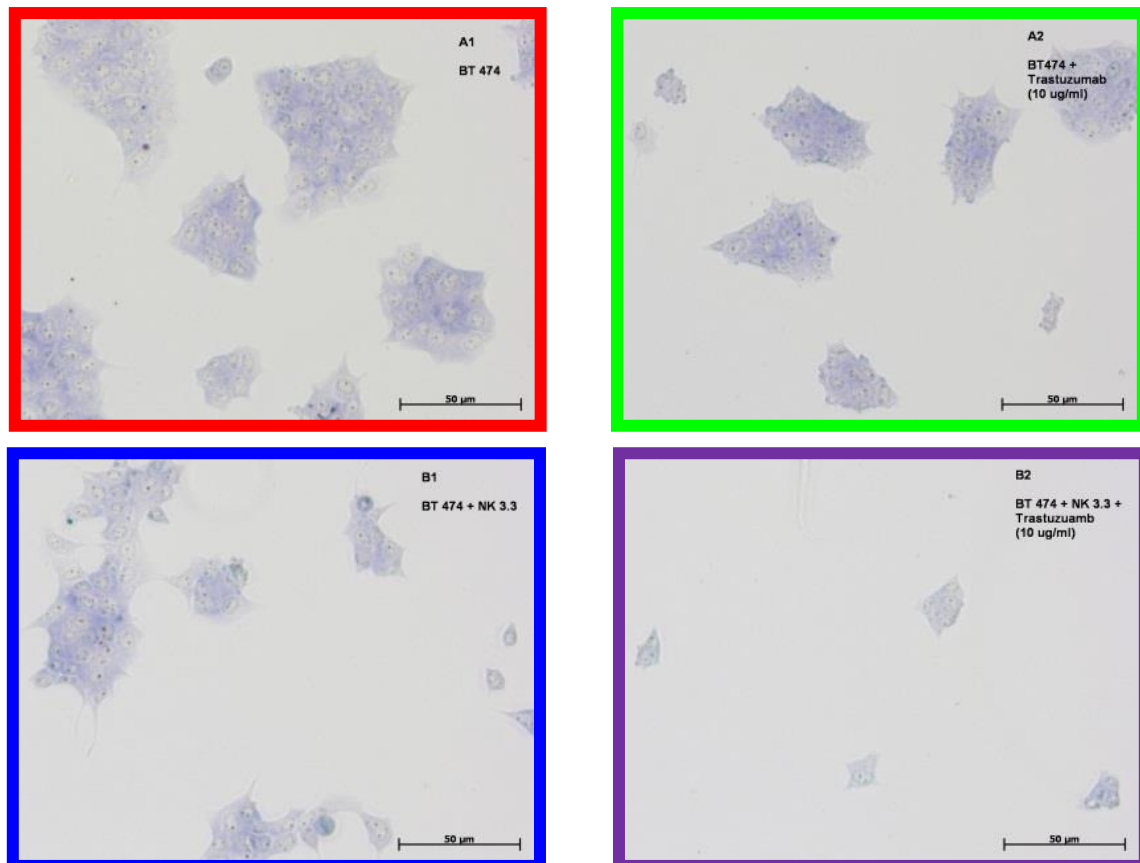
In der Auswertung der Wachstumskurven für den Zeitraum 10 bis 40 Stunden zeigte sich jeweils eine stetig, annähernd logarithmische Proliferation der Zellen, die schließlich a. e. aufgrund einer Kontaktinhibition in einem CI-Plateau ausläuft.

Farblich wurden in den abgebildeten Graphen die einzelnen Ansätze kodiert. Die rote Kurve entspricht hierbei der reinen Mammakarzinommonokultur, deren normalisierter CI, nach der Zugabe der Effektorzellen zu den anderen Ansätzen, weiter zunimmt. Die Zugabe des therapeutischen Antikörpers Trastuzumab hemmt zwar das Wachstum der Tumorzellen signifikant, der  $\Delta$ CI steigt in einem geringen Ausmaß jedoch weiter an (grüne Kurve). In dunkelblau werden die berechneten Delta Cell Indices der Cokulturen aus BT-474<sub>WT</sub> und den natürlichen Killerzellen NK 3.3 dargestellt. Hier ergibt sich nach einem initialen kurzen Anstieg des  $\Delta$ CI, der sich a. e. durch morphologische Veränderungen der Targetzellen erklären lässt, ein signifikanter Abfall der Messwerte. Diese Abnahme der Zelladhärenz als Surrogatmarker der induzierten Zellapoptose wird durch die Zugabe von Trastuzumab weiter gesteigert. Zudem zeigt sich eine Konzentrationsabhängigkeit des für die ADCC-Reaktion notwendigen Antikörpers. Während sowohl 10  $\mu$ g/ml [lila Kurve], als auch 2,5  $\mu$ g/ml [hellblaue

Kurve] Herceptin in einem annähernd gleich großen Ausmaß zum natürlichen Zelltod der Mammakarzinomzellen führen, bewirkt eine Konzentration von 0,1 µg/ml [orange Kurve] eine geringer ausgeprägte ΔCI-Abnahme.

Als Kontrollen wurde, neben einem reinen Kulturmediumansatz, eine Probe lediglich mit natürlichen Killerzellen [gelbe Kurve] mitgeführt, die als Suspensionszellen keine Veränderungen des Cell Index bewirken.

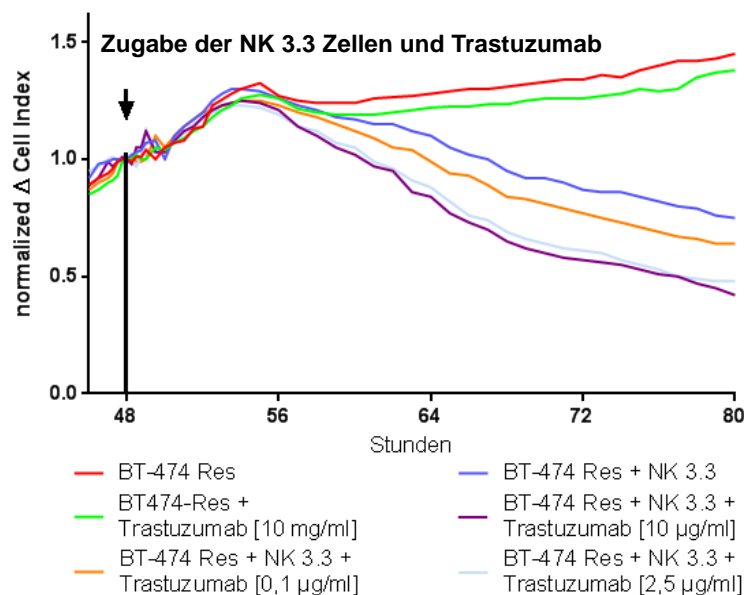
In den vier Photographien der Abbildung 53b bestätigen sich die xCelligence-Messwerte auf mikroskopischer Ebene. Die Rahmenfarbe korreliert mit den therapeutischen Ansätzen der Abbildung 53a.



**Abb. 53b Korrelierende mikroskopische Aufnahmen der im xCelligence-untersuchten Kokulturen aus Abbildung 53a.**  
Die farbigen Bildrahmen stimmen mit der Codierung der Abbildung 53a überein.

### **BT-474<sub>Resistent</sub>**

In Kapiteln 5.1.1 und 5.1.3 wurde die erworbene Resistenz gegenüber Trastuzumab von BT-474<sub>Resistent</sub> Zellen nach einer mehrmonatigen Kultivierung unter diesem therapeutischen Antikörper dargelegt. In verschiedenen Readoutparametern zeigten diese Zellklone eine signifikant geringere Sensitivität gegenüber einer direkten Herceptin-Therapie im Vergleich zu den Wildtypzellen. Im Rahmen der nachfolgenden xCelligence-Experimente wurden diese Zellen nun bzgl. der indirekten immunzellvermittelten Mechanismen von Trastuzumab im Sinne einer ADCC-Reaktion untersucht. Der Versuchsaufbau sowie dessen Durchführung orientierte sich dabei an dem der Wildtypzellen, nur das der Versuch bereits bei deskriptiv eindeutigen Ergebnissen nach 80 h beendet wurde.



**Abb. 54**  
 xCelligence-Assay zur kinetischen Analyse von ADCC-Cokulturen mit BT-474<sub>Resistent</sub> Zielzellen in An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3 und des monoklonalen anti-Her2-Antikörpers Trastuzumab.

Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von mindestens zwei unabhängigen Wiederholungen. Die einzelnen Versuchsansätze in den xCelligence-Diagrammen sind farbig, wie in der nebenstehenden Legende beschrieben, codiert.

Die reine BT-474<sub>Res</sub> Monokultur [rote Kurve] weist einen parallelen Verlauf zur grünen Kurve auf, die die Trastuzumab-behandelten Zellen repräsentieren. Dies unterstreicht im Vergleich zu den Wildtypzellen (vgl. Abb. 53a) die aufgehobene proliferationshemmende Wirkung des Antikörpers gegenüber den resistenten Zellklonen. Auch unter Behandlung proliferieren die Zellen und nehmen somit stetig Einfluss auf die gemessene Impedanz.

Wie bei den Wildtypzellen bewirkt die Kokultivierung mit NK 3.3 Zellen [dunkelblaue Kurve] einen direkten zytotoxischen Effekt mit einer deutlichen Abnahme der  $\Delta$ CI-Werte. Durch Zugabe des therapeutischen Antikörpers lässt sich dieser, in Abhängigkeit der Herceptin-Konzentration [orange, hellblaue bzw. lila Kurve], weiter steigern. Somit ist eine signifikante indirekte Apoptoseinduktion im Sinne einer ADCC-Reaktion zu postulieren.

### JIMT-1

Den Abschluss des Untersuchungsportfolios zu den xCelligence-Experimenten an Her2<sup>+</sup>-Zellen bildeten Ansätze mit JIMT-1 Zellen. Diese Mammakarzinomzelllinie entstammt dem Isolat einer pleuralen Mammakarzinommetastase und wurde vielfach als intrinsisch resistent gegenüber einer direkten Trastuzumab-Therapie beschrieben<sup>199</sup>. Auch hier glich der Versuchsablauf den obigen Vorgaben. Es wurde lediglich auf die Modulation der Antikörperkonzentration verzichtet und die Ansätze ab Start der Kokultur für insgesamt drei Tage vermessen. Die im Versuch ermittelten Delta Cell Indices ( $\Delta$ CI) sind in Abbildung 55 graphisch aufgetragen und spiegeln die Wachstumskurven von JIMT-1 in Mono- und Cokulturen wieder. Der Beginn der Kokultur ist erneut über die schwarze Markierung definiert.

Insgesamt führt eine JIMT-1 Kultivierung in E-Plates zu eher höheren  $\Delta$ CI-Werten, was a. e. durch die flachere Zellmorphologie mit der verbundenen höheren Adhärenz zu erklären ist. Ca. 85 h nach Zellaussaat scheinen die gemessenen Impedanzen sogar wieder abzufallen bzw. ein Plateau zu erreichen. Wie erwartet resultiert eine Trastuzumab-Applikation [grüne Kurve] bei JIMT-1 Zellen in keiner Wachstumsinhibition. Die Zellen erreichen - ggf. geringgradig zeitversetzt - die gleichen Cell Indices wie die unbehandelten Proben [rote Kurve].

Die Kokultivierung mit natürlichen Killerzellen [dunkelblaue Kurve] führt zu einer deutlichen Abnahme der  $\Delta$ CI-Werte. Es bedarf jedoch einer scheinbar deutlich längeren Zellinteraktion (BT-474 ca. 6 h vs. JIMT-1 ca. 20 h) bis die Apoptoseinduktion den proliferationsbedingten Zellersatz kompensieren kann. Einen zusätzlichen Effekt einer begleitenden Trastuzumab-Behandlung [lila Kurve] konnte in den Cokulturen jedoch kaum nachgewiesen werden. Eventuell bedingt die geringere Her2-Expression bzw. die reduzierte Trastuzumabbindung an die Oberfläche dieser intrinsisch resistenten Zelllinie (vgl. Abb. 47) die fehlende Effektivität der NK-Zellen, JIMT-1 Zellen im Sinne einer ADCC-Reaktion abzutöten.



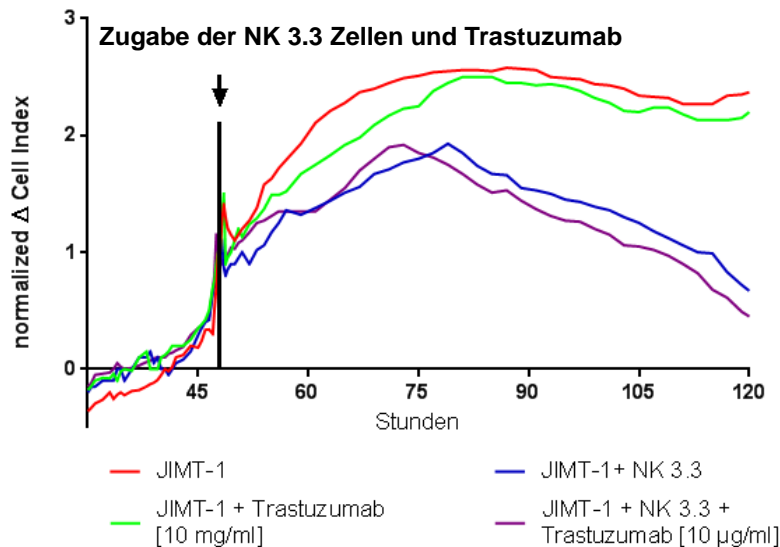


Abb. 55

xCelligence-Assay zur kinetischen Analyse von ADCC-Cokulturen mit intrinsisch resistenten JIMT-1 Zielzellen in An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3 und des monoklonalen anti-Her2-Antikörpers Trastuzumab.

Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von mindestens zwei unabhängigen Wiederholungen. Die einzelnen Versuchsansätze in den xCelligence-Diagrammen sind farbig, wie in der nebenstehenden Legende beschrieben, codiert.

### 5.2.3 Apoptose-Assays

Für weiterführende Analysen wurden zusätzlich Annexin-DAPI-Assays durchgeführt. Diese durchflusszytometrischen Messungen erlauben, spezifisch die Fraktionen der vitalen, der früh- sowie der spätapoptotischen Zellen zu differenzieren und zu erfassen. Auf diese Weise gelingen Aussagen über die Mechanismen, wie Trastuzumab und Pertuzumab immunvermittelt maligne Zellen eliminiert.

#### **BT-474<sub>WT</sub>**

Die Auswertung der durchflusszytometrisch ermittelten Apoptoseinduktion in Tumorzellen der Cokultur mit NK 3.3 wurde analog zu der der Monokulturen aus Abschnitt 5.1.3 durchgeführt. Die genauen Gatingstrategien sowie die theoretischen Grundlagen sind detailliert in Kapitel 4.2.3.3 dargestellt.

Die Versuchsergebnisse zu **BT-474<sub>WT</sub>** als untersuchte Targetzellen sind in Abbildung 56 graphisch zusammengefasst.

In Monokultur [schwarze Kurve] befinden sich zu allen untersuchten Zeitpunkten rund 8 % der BT-474 Zellen (5,3 % bis 10,5 %) in Apoptose. Die Zugabe von Trastuzumab [dunkelblaue Kurve] bzw. Pertuzumab [magenta Kurve] führt - wie bereits in den Monokulturexperimenten in Kapitel 5.1.3 dargestellt - zu keinem gesteigerten Zelltod. Hier beträgt der durchschnittliche Anteil der Zellen im natürlichen Zelltod gemittelt über die vier Messzeitpunkte ca. 9,7 % bzw. 9,1 %.

In Cokultur mit natürlichen Killerzellen [schwarz gepunktete Kurve] steigt der Prozentsatz von Zellen in Apoptose in Abhängigkeit der Cokulturdauer an. Entsprechend reduzierte sich der Anteil der lebenden Zellen nach 24 h um 12,1 Prozentpunkte ( $\pm 2,2$  %), nach 48 h um 18,0 Prozentpunkte ( $\pm 3,4$  %), nach drei Tagen um 25,2 Prozentpunkte ( $\pm 5,5$  %) und nach vier Tagen um 29,8 Prozentpunkte ( $\pm 1,3$  %).

Die zusätzliche Applikation von Trastuzumab [dunkelblau gepunktete Kurve], Pertuzumab [magenta gepunktete Kurve] oder beiden therapeutischen Antikörpern [grau gepunktete Kurve] steigerte die Tumorzellfraktion in Apoptose im Vergleich zur korrelierenden unbehandelten Cokultur weiter. Auch hier korreliert die Zunahme des ADCC-Effektes mit der Dauer der Zellinteraktion. So konnte hier nach jeweils 4 Tagen Cokultur ein maximaler Apoptoseanteil von 58,8 % ( $\pm 3,6$  %) bei Trastuzumab, von 45,6 % ( $\pm 1,1$  %) bei Pertuzumab sowie von 59,3 % ( $\pm 1,6$  %) bei Zugabe beider monoklonalen Antikörper vermessen werden. Die Two-way ANOVA Analyse ergab für diesen Anstieg, im Sinne des ADCC-Effektes, jeweils einen signifikanten p-Wert von  $p < 0,0005$ . Die Kombination von Trastuzumab und Pertuzumab führte jedoch im Vergleich zur Zugabe nur eines Antikörpers zu keiner signifikanteren Steigerung der Apoptoseinduktion.

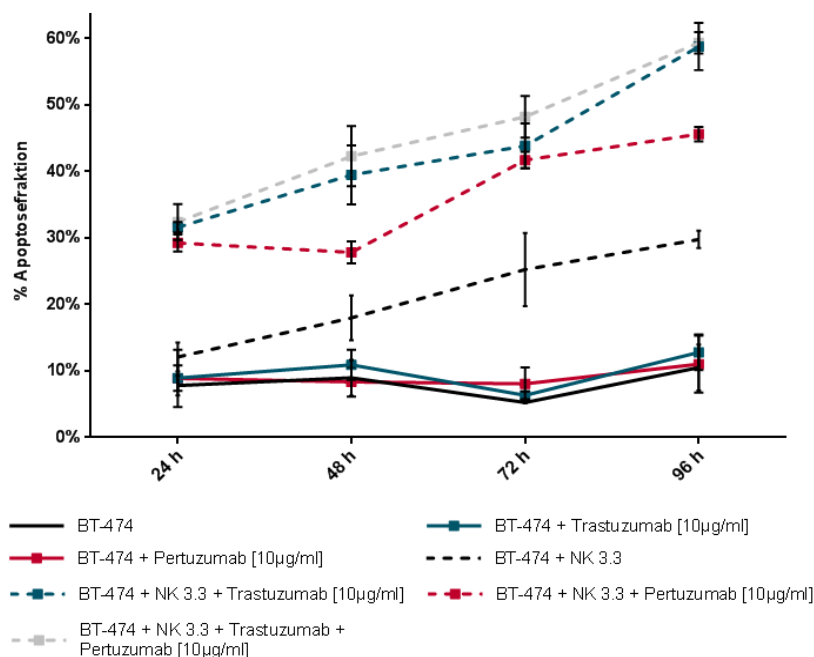


Abb. 56

Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in BT-474 Wildtypzellen durch Trastuzumab und Pertuzumab bei An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3.

Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern (= SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Start der Cokultur.

Die durchflusszytometrische Messung der Her2-Expression der Mammakarzinomzellen in den unterschiedlichen Ansätzen sowie im zeitlichen Verlauf wies keine signifikante Veränderung auf, sodass auf eine detaillierte Darstellung dieser Daten im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wird.

### **BT-474<sub>Res</sub>**

Auch die BT-474<sub>Res</sub> Zellen wurden in Mono- und gemeinsamer Kultur mit NK 3.3 und unter Antikörperbehandlung hinsichtlich ihres Anteils an apoptotischen Zellen nach 1, 2, 3 und 4 Tagen analysiert. Die ermittelten Messergebnisse können der Abbildung 57 graphisch entnommen werden.

In den Monokulturen [schwarze Kurve] ließen sich gemittelt über die vier Messpunkte etwa 5 % (3,4 % bis max. 6,3 %) der Zellen Annexin V-FITC oder Annexin V-FITC / DAPI positiv anfärben. Somit lag der Apoptoseanteil annähernd auf dem Niveau der Wildtyp-Zellen (vgl. Abb. 56). Wie bereits in den Versuchen zur Einordnung der Chancen und Limitationen eines direkten anti-Her2-Targetings (vgl. Kap. 5.1) beschrieben, bedingt eine Therapie mit Trastuzumab [dunkelblaue Kurve] oder Pertuzumab [magenta Kurve] keine Apoptoseinduktion in diesen Zellen.

Nach Zugabe der natürlichen Killerzellen [schwarz gepunktete Kurve] zeigen diese Cokulturen hingegen einen hochsignifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen (Two-way ANOVA:  $p < 0,005$ ). Auch durch die Applikation der Antikörper kann bei den BT-474<sub>Res</sub> Zellen mit erworbener, direkter Trastuzumab-Resistenz der Prozentsatz der Tumorzellen in Apoptose weiter signifikant erhöht werden. So ergaben die Messungen zur Trastuzumab-vermittelten Zytotoxizität [dunkelblau gepunktete Kurve] nach 24 h einen Anteil von 28,8 % ( $\pm 5,3$  %). Mit der Versuchsdauer korrelierte auch hier der Anteil [48h: 34,7 % ( $\pm 3,8$  %); 72h: 34,9 % ( $\pm 1,8$  %); 96h: 48,2 % ( $\pm 2,6$  %)]. Im direkten Vergleich zur unbehandelten Cokultur zeigt sich in der Two-way ANOVA ein hochsignifikanter Anstieg ( $p < 0,005$ ), was mit der erhaltenen Sensitivität gegenüber den immunzellvermittelten Mechanismen von Trastuzumab aus Abschnitt 5.2.1 im dynamischen xCelligence-Assay übereinstimmt. Zwar stimulierte Pertuzumab [magenta gepunktete Kurve] die NK 3.3 Zellen in einem etwas geringeren Ausmaß zur ADCC doch auch hier ergibt sich ein signifikanter ADCC-Effekt ( $p < 0,05$ ). Die Kombination beider Antikörper [grau gepunktete Kurve] führte vergleichbar zu den Untersuchungen an den Wildtypzellen (vgl. Abb. 56) erneut zu keiner additiven Apoptoseinduktion. Unter doppelter Antikörperbehandlung betrug die Apoptosefraktion von BT-474<sub>Res</sub> Zellen in Cokultur 32,3 % ( $\pm 1,9$  %), 34,4 % ( $\pm 2,1$  %), 37,9 % ( $\pm 2,6$  %) bzw. 54,2 % ( $\pm 3,2$  %) nach 1, 2, 3, bzw. 4 Tagen. In der Varianzanalyse nach Two-way ANOVA zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu einer reinen Trastuzumab-vermittelten Zytotoxizität ( $p > 0,05$ ).

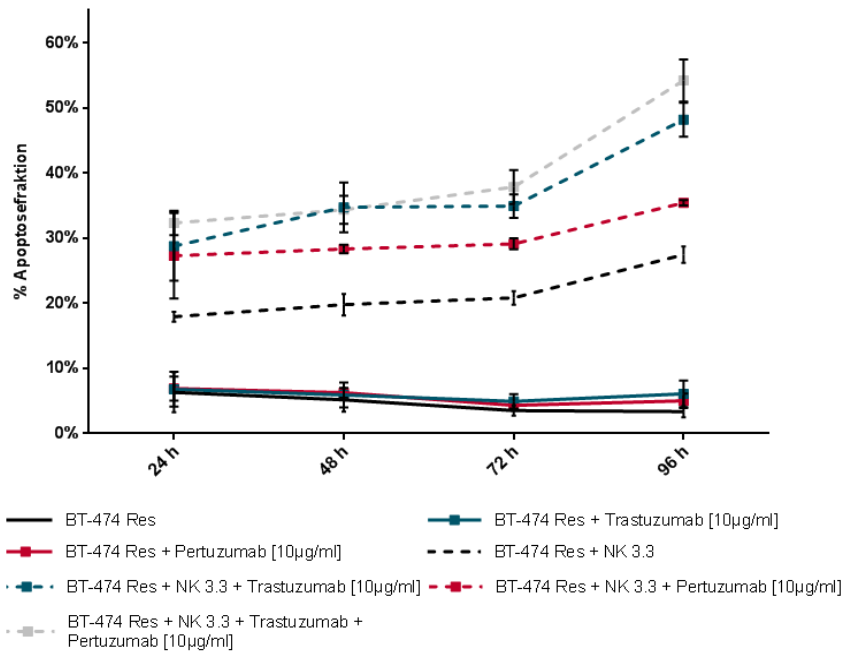


Abb. 57

Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in resistenten BT-474 Zellen durch Trastuzumab und Pertuzumab bei An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3.

Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern (= SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Start der Kokultur.

## JIMT-1

Die Auswertung von JIMT-1 in Kokulturen mit NK 3.3 am Durchflusszytometer als Annexin-DAPI-Assay erfolgte nach demselben Prinzip wie auch bei BT-474. Da bereits aus den dynamischen xCelligence-Untersuchungen erkennbar war, dass sich die intrinsische Trastuzumab-Resistenz auch auf die immunzellvermittelten Therapiemechanismen erstrecken, wurden die Ergebnisse zur Validierung dieser lediglich mit Trastuzumab als Antikörper durchgeführt. Die Ergebnisse der mittleren Apoptoseinduktion aus jeweils drei unabhängigen Experimenten sind Graphik 58 zusammengefasst. Bemerkenswert fielen im Rahmen der Auswertung die deutlich größeren Standardfehler auf, die wiederum als Fehlerbalken mitabgebildet wurden.

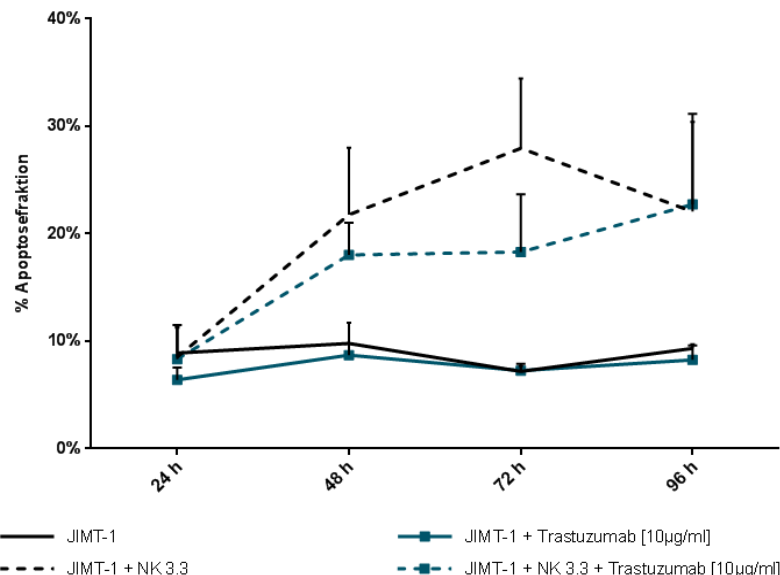


Abb. 58

Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in intrinsisch trastuzumabresistente JIMT-1 Zellen durch Trastuzumab und Pertuzumab bei An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3.

Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern (= SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Start der Kokultur.

Der Apoptoseanteil in den Monokulturen [schwarze Kurve] betrug gemittelt über die gesamte Versuchsdauer von 4 Tagen 8,8 % ( $\pm 1,3$  %). Auch die Anwesenheit von Trastuzumab [dunkelblaue Kurve] führt nicht zu einer weiteren Steigerung dieses Prozentsatzes.

Durch die Zugabe von NK 3.3 Zellen [schwarz gepunktete Kurve] lässt sich jedoch der Anteil der apoptotischen Zellen signifikant erhöhen. Auch hier korreliert der Prozentsatz der avitalen Mammakarzinomzellen mit der Dauer der Kokultivierung [Two-way ANOVA,  $p < 0,05$ ; 24 h: 8,5 % ( $\pm 2,7$  %); 48 h: 21,8 % ( $\pm 6,2$  %); 72 h:

28,0 ( $\pm 6,5$  %) und 96 h: 22,1 ( $\pm 8,3$  %)]. Bemerkenswert fällt im obigen Kurvenverlauf, im Vergleich zu den Untersuchungen an BT-474<sub>WT</sub> und BT-474<sub>Res</sub>, die Latenz bis zur deutlichen Zunahme der Apoptoseinduktion auf. Während nach 24 Stunden gemeinsamer Kultivierung noch kein Unterschied im Vgl. zur JIMT-1 Monokultur erkennbar ist, kommt es nach 2 Tagen zu einer deutlichen Zunahme der apoptotischen Mammakarzinomzellen. Diese Beobachtungen decken sich mit den kinetischen Untersuchungen im xCelligence-Assay (vgl. Abb. 55).

In der dunkelblau gepunkteten Kurve sind die gemittelten Messergebnisse in Folge einer Trastuzumab-vermittelten Zytotoxizität der NK 3.3 Zellen an JIMT-1 dargestellt. In diesen Ansätzen befinden sich im Vergleich zur Cokultur ohne Trastuzumab sogar eher weniger Tumorzellen in Apoptose. Dieser Unterschied zeigt sich jedoch statistisch als nicht signifikant. Somit kann aus dieser Gegenüberstellung für die intrinsisch trastuzumabresistente Mammakarzinomzelllinie JIMT-1 ebenso auf eine Insensitivität gegenüber einer Trastuzumab-vermittelten ADCC-Reaktion geschlossen werden.

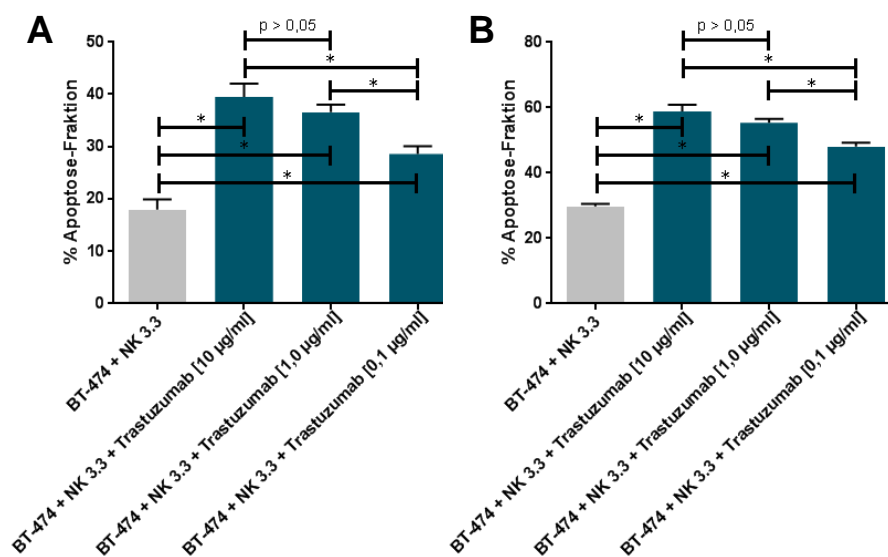
#### 5.2.4 Modulation der Effektivität und des Potentials der ADCC

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene Möglichkeiten zu analysieren die Fraktion der apoptotischen Zellen, induziert durch ADCC, zu modulieren. Hierzu wurden Annexin-DAPI-Assays mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen durchgeführt, die Effektor-Targetzell-Ratio variiert und die NK 3.3 Zellen durch verschiedene Zytokine stimuliert.

#### Einfluss der Trastuzumab-Konzentration auf den ADCC-Effekt

Zur Klärung der Frage, inwiefern die vorhandene Antikörpermenge Einfluss auf die Effektivität der ADCC-Reaktion nimmt, wurden Annexin-DAPI-Assays mit verschiedenen Trastuzumab-Konzentrationen durchgeführt. Hierbei galt es zu evaluieren, ob die herausgearbeiteten Effekte der indirekten Apoptoseinduktion auch bei reduzierten Antikörperkonzentrationen nachweisbar blieben. Entsprechend den Ergebnissen zur Kinetik der Apoptoseinduktion in den BT-474 Zellen (vgl. 5.2.1 und 5.2.3) wurden für diese Untersuchungen jeweils ein Zeitraum von 48 bzw. 96 Stunden ausgewählt.

In Abb. 59A und B sind die aus drei unabhängigen Experimenten berechneten Mittelwerten mit den entsprechenden Standardfehlern (SEM) als Fehlerbalken dargelegt.



Vergleichbar zu den Annexin-DAPI-Assays zur kinetischen Einordnung des NK-zellvermittelten ADCC-Effektes (vgl. Abb. 56), führt die Zugabe von Trastuzumab zu einer Cokultur aus der Mammazelllinie BT-474 und NK 3.3 Zellen zu etwa einer Verdoppelung der Zellen in Apoptose (Zunahme um den Faktor 2,20 nach 48 h bzw. 1,97 nach 96 h). Die Reduktion der zugesetzten Trastuzumabmenge um den Faktor 10 auf 1,0 µg

Antikörper pro 1 ml Kulturmedium führt nach der statistischen Analyse im Tukey's multiple comparisons Test zu keiner signifikanten Abnahme des vermittelten natürlichen Zelltodes ( $p > 0,05$  für 48 h und 96 h), sodass auch bei dieser Antikörperkonzentration von einer ausreichenden Sättigung der Zielzellen ausgegangen werden kann. Erst mit einer nochmaligen Zehntelung der Antikörperkonzentration auf 0,1  $\mu\text{g/ml}$  zeigt sich für beide Messzeitpunkte jeweils eine statistisch signifikante Abnahme der avitalen Zellen sowohl im Vergleich zur 10  $\mu\text{g/ml}$  als auch zu 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Konzentration. Nach 48 Stunden sind entsprechend noch 28,6 % ( $\pm 1,5$  %) bzw. nach 96 h noch 48,0 % ( $\pm 1,2$  %) der Zellen in Apoptose. Dennoch bedingt auch diese geringe Applikation von Trastuzumab im Vergleich zu reinen Cokultur einen signifikanten ADCC-Effekt ( $p < 0,05$  für 48 h und 96 h).

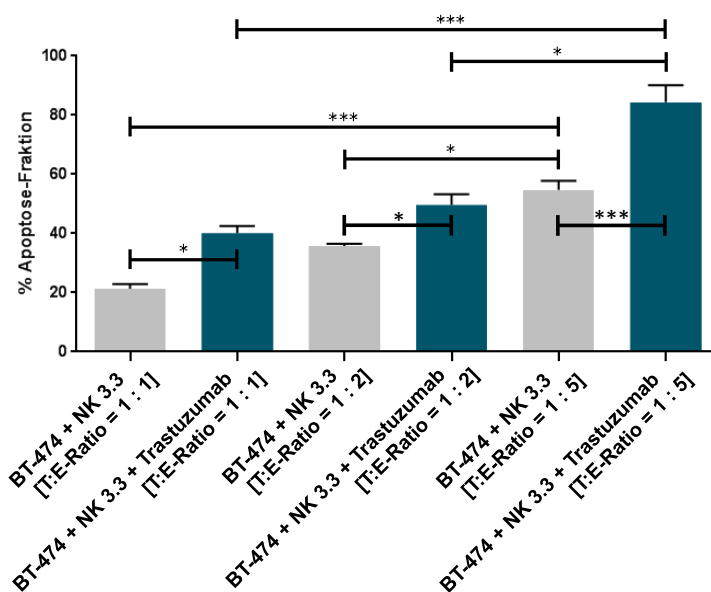
Aus den vorliegenden Daten geht somit hervor, dass ab einer Trastuzumabkonzentration von 1,0  $\mu\text{g/ml}$  bereits eine Sättigung erreicht wird und eine weitere Zugabe des therapeutischen Antikörpers zu keiner weiteren Steigerung der induzierten Apoptosefraktion führt.

### Einfluss der Effektor-Target-Zell-Ratio

Im Balkendiagramm 60 werden die Mittelwerte gemeinsam mit den entsprechenden Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten zur Untersuchung des Einflusses der Effektor-Target-Zell-Ratio auf einen ADCC-Effekt graphisch zusammengefasst. Die Messungen erfolgten nach jeweils 48-stündiger Cokultivierung. Die eingesetzte Trastuzumab-Konzentration betrug 10,0  $\mu\text{g/ml}$  in allen Ansätzen.

In den untersuchten Cokulturen bestätigt sich bei allen untersuchten E-T-Verhältnissen eine signifikante Trastuzumab-vermittelte Induktion des natürlichen Zelltodes im Sinne einer ADCC-Reaktion. In der Cokultur mit einer 1 : 5-Ratio ließ sich im Tukey's multiple comparisons Test sogar eine hochsignifikante indirekte Apoptoseinduktion vermessen.

Eine Verdoppelung des Verhältnisses von NK 3.3 zu Mammakarzinom-Zellen führt unabhängig einer möglichen Anwesenheit der therapeutischen Antikörper hingegen nicht zu einer statistisch Zunahme dieses Anteils an toten Zellen. Erst mit dem Einsatz einer 1 : 5-Ratio von Effektorzellen kann nun sogar ein hochsignifikanter Anstieg ( $p < 0,001$ ) der Apoptoseinduktion erzielt werden. Auf diese Weise kann ein Apoptoseanteil in den Mammakarzinomzellen von 54,80 % ( $\pm 3,0$  %) bei Ab- bzw. von 84,37 % ( $\pm 5,7$  %) bei Anwesenheit von Trastuzumab erreicht werden. In der Varianzanalyse zwischen der Cokultur mit 1:2-Verhältnis verglichen mit dem Ansatz, aus einer Tumorzelle auf fünf Effektorzellen, ergibt sich im Tukey's multiple comparisons Test ein signifikanter Unterschied bei einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$ .



**Abb. 60**

**Annexin-DAPI-Assay zur Untersuchung des Einflusses der Effektor-Target-Zell-Ratio auf den ADCC-Effekt.**

Die eingesetzte Trastuzumab-Konzentration betrug jeweils 10,0  $\mu\text{g/ml}$ . Die Messung erfolgte nach 48 h Cokultivierung.

Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern (= SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede sind mit horizontalen Balken eingezeichnet, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ausgewählte Varianzen vermerkt sind.

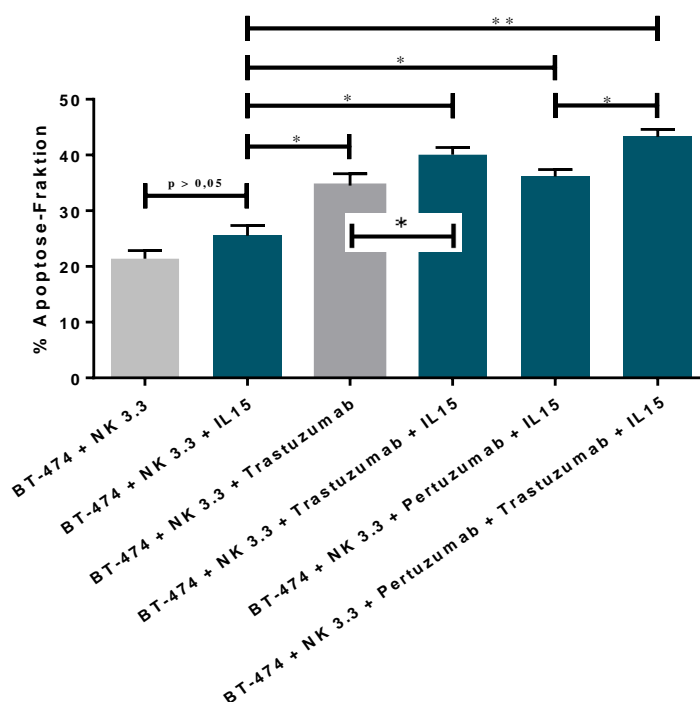
[\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ]

### Vorstimulation der NK 3.3 Zellen

Den dritten Untersuchungsabschnitt zu möglichen Faktoren zur Steigerung der ADCC vermittelten Apoptoseinduktion bildeten Experimente, die den Einfluss einer vorgeschalteten oder parallelen Stimulation der natürlichen Killerzellen näher betrachteten. Hierzu wurden NK 3.3 Zellen mit verschiedenen Interleukinen unterschiedlicher Konzentration behandelt. In Abbildung 61 sind die berechneten Mittelwerte mit entsprechenden Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten zur Stimulation der NK 3.3 Zellen mit IL-15 in einer Konzentration von 10 ng/ml dargestellt. Die Inkubation der natürlichen Killerzellen begann bereits 72 Stunden vor und wurde während der Cokultivierung fortgesetzt. Als Targetzellen kamen erneut BT-474 Zellen zum Einsatz.

Die vorgeschaltete und parallele Stimulation mit IL-15 von NK 3.3 Zellen führt zu einer nicht signifikanten Zunahme der apoptotischen BT-474 Fraktion um 4,1 Prozentpunkte auf 25,5 % ( $\pm 1,8$  %). Einen signifikanten ADCC-Effekt vermittelt durch Trastuzumab, Pertuzumab bzw. einer Kombination beider Antikörper lässt sich hingegen in allen IL-15 stimulierten Ansätzen nachweisen. Hierbei betrug der Anteil der BT-474 Zellen, die sich durchflusszytometrisch als Annexin V-FITC<sup>+</sup> bzw. Annexin V-FITC<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup> vermessen ließen 40,1 % ( $\pm 1,3$  %), 36,1 % ( $\pm 1,3$  %) bzw. 43,3 % ( $\pm 1,3$  %). In der statistischen Bewertung nach One-way ANOVA ergibt sich für die kombinierte Zugabe von Trastuzumab und Pertuzumab sogar ein hochsignifikanter Anstieg der BT-474 Zellen im natürlichen Zelltod im Vergleich zur reinen Cokultur. Des Weiteren weist dieser Ansatz auch einen signifikant höheren Anteil an toten Mammakarzinomzellen im Vergleich zu den Cokulturen, die lediglich einem Pertuzumab-vermittelten zytotoxischen Effekt der NK 3.3 Zellen ausgesetzt waren, auf.

Die Zugabe von Interleukin selbst zeigte in den durchgeführten Annexin-DAPI-Assays im direkten Vergleich lediglich bei Cokulturansätzen mit Trastuzumab einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 61**  
Annexin-DAPI-Assay zur Untersuchung des Einflusses einer vorgeschalteten bzw. parallelen NK-Zellstimulation mit IL15 auf den ADCC-Effekt.

Die eingesetzte Trastuzumab- bzw. Pertuzumab Konzentration betrug jeweils 10,0 µg/ml. Die Messung erfolgte nach 48 Stunden Cokultivierung.

Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardfehlern (= SEM) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Unterschiede sind mit horizontalen Balken eingezeichnet, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ausgewählte Varianzen vermerkt sind.

[\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ]

Vergleichbare Untersuchungen wurden ebenfalls mit einer Vorstimulation der natürlichen Killerzellen mit IL2 und IL6 durchgeführt. Die verwendeten NK-Zellen der Zelllinie NK 3.3 werden standardgemäß in einem IL2 haltigen Medium kultiviert und sämtliche Versuche mit diesen Zellen erfolgten in der vorliegenden Arbeit entsprechend unter der Standarddosis von 200 IU rhIL-2 pro ml Kulturmedium. Eine weitere Steigerung der IL-2 Mengen, wie auch ein kurzfristiger Entzug dieses Interleukins führte jedoch nicht zu einer Änderung der Apoptoseinduktion in den Tumorzellen. Auch die Zugabe von IL-6 bewirkte keine Veränderung in den Cokulturexperimenten. Um den Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht unnötig weiter auszudehnen, wurde auch hier auf eine detaillierte Darstellung dieser Daten verzichtet.

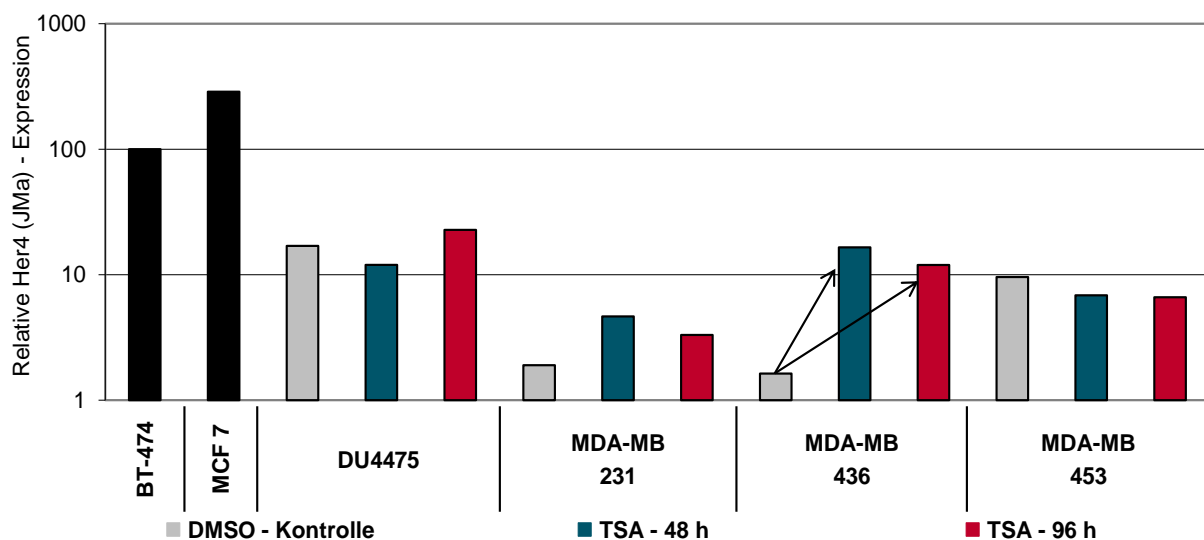


## 5.3 CHARAKTERISIERUNG UND MODULATION DES HER4 REZEPTORS

### 5.3.1 Epigenetische Reaktivierung von Her4 als Tumorsuppressorgen

Die nachfolgenden Experimente beruhen auf der molekularbiologischen These, dass Her4 wie andere tumor-suppressive Proteine epigenetisch im Rahmen der Tumorentwicklung unterdrückt wird. Durch Zugabe demethylierender Substanzen gelingt es, diesen Wachstumsrezeptor zu reaktivieren.

Die hierbei in verschiedenen triple negativen Mammakarzinomzelllinien induzierte Her4-Expression wird in Graphik 62 zusammengefasst. Als demethylierende Substanz wurde TSA den Her4-Zelllinien über einen Zeitraum von 48 h [blaue Balken] bzw. 96 h [rote Balke] zugegeben und im Anschluss die relative JMa-Expression als quantitative real-time PCR ermittelt. Die jeweils eingesetzte TSA-Konzentration entsprach derjenigen, die in vorgeschalteten Etablierungsversuchen die Zellen prozentual nicht zu sehr in Apoptose versetzte.



**Abb. 62 qRT-PCR zur Detektion der Her4-Expression.** Logarithmische Auftragung der relative Her4 (JMa) - Expression in verschiedenen TNBCs nach Zugabe des HDAC-Inhibitors TSA (exemplarische Auswahl der untersuchten Zelllinien). Die jeweilige TSA-Konzentration wurde zelllinienspezifisch in Vorversuchen ermittelt. Eingesetzt wurden: 0,05  $\mu$ M TSA bei DU4475 Zellen, 0,2  $\mu$ M TSA bei MDA-MB 231 Zellen, 0,2  $\mu$ M TSA bei MDA-MB 436 Zellen und 0,05  $\mu$ M TSA bei MDA-MB 453 Zellen.

Insgesamt erbrachten die Analysen heterogene Ergebnisse. Während einige Zelllinien keine Veränderungen in ihrer Her4-Expression zeigten, schien sie bei der Zelllinie MDA-MB 453 sogar mit der TSA-Behandlungsdauer abzunehmen. Lediglich bei MDA-MB 436 ergab sich eine deutliche Zunahme der nachweisbaren Her4-Rezeptoren infolge der TSA-Zugabe. Im quantitativen Vergleich zu typischen Her4 positiven Zelllinien, wie z. B. MCF7 und unter Berücksichtigung der logarithmischen Auftragung in Abb. 62 führte die epigenetische Reaktivierung von Her4 jedoch nur zu einem sehr geringen Expressionsniveau.

Vorausgegangen waren diesen Screening-Untersuchungen Experimente, die sich an der von Das et al. publizierte Möglichkeit orientierten, mit Hilfe einer Kombinationsbehandlung der beiden demethylierende Substanzen DAC und TSA in den Mammakarzinomzelllinien BT-20, HCC1806 und HCC1937 Her4 zu reaktivieren<sup>170</sup>. Da dies jedoch trotz umfangreicher Untersuchungen nicht zu etablieren war, wird an dieser Stelle auf eine weiterführende Darstellung der Ergebnisse verzichtet.

### 5.3.2 Transfektion von Her4 (JMaCyt1 u. JMaCyt2)

Die Grundlage für ein weiteres Modell zur Einordnung des prädiktiven Einflusses einer Her4-Coexpression auf eine Target-spezifische Behandlung von Tumorzellen bildete die semistabile Transfektion fast vollständig Her4 negativer BT-474 Zellen. Hierbei gelang es, mittels entsprechender Genabschnitte in den Wildtypzellen die Her4-Spleißvarianten **ErbB4 JMaCyt1** und **ErbB4 JMaCyt2** zur Expression zu bringen.

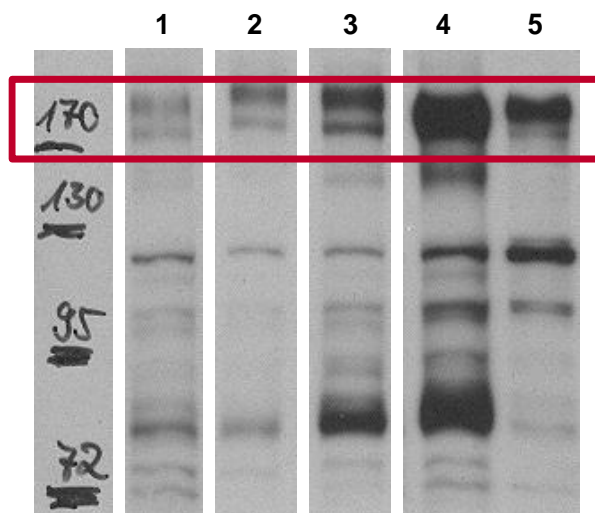
Nachfolgende Versuchsergebnisse verdeutlichen auf RNA-, Protein- und zellulärer Ebene den Erfolg des Gentransfers in die BT-474<sub>Wildtyp</sub> Zellen. Die längerfristige Beständigkeit der semistabilen Her4-Transfektion wurde über einen Zeitraum von max. 15 Passagen dokumentiert. Hierzu wurden fortlaufend Zellen für Protein- bzw. RNA-Nachweise abgezweigt und das jeweilige Her4-Expressionsniveau vermessen.

#### Western Blot-Analyse

Wie unter 4.4.5 ausführlich beschrieben kann die ErbB4-Expression auf Proteinebene mit einem polyklonalen Antikörper, der gegen das C-terminale Ende von Her4 gerichtet ist, nachgewiesen werden.

Selbst ohne densitometrische Auswertung zur weiterführenden Quantifizierung bestätigen die deutlich stärker geschwärzten Banden bei den transduzierten Zellen im Vergleich zu den Wildtypkontrollen die erfolgreiche Transfektion. Auf Höhe von 180 kDa wird die deutlich stärkere Expression der jeweiligen Her4-Rezeptor-splicevariante sichtbar (vgl. Abb. 63).

Um eine relative Korrelation mit etablierten Her4<sup>+</sup>-Zelllinien zu ermöglichen, wurden Zelllysate von MCF7 und ZR-75.1 mitgeführt. MCF7 weist hierbei intrinsisch eine sehr starke, ZR-75.1 eine mittlere Her4-Expression auf, wobei beide wiederum einen höheren Proteingehalt als die transfizierten BT-474 Zellen besitzen.



**Abb. 63**

**Western Blot Analysen aus Zelllysaten der Mammakarzinomzelllinien BT-474, MCF7 und ZR-75.1.**

Nachgewiesen wurde die Expression des ErbB4-Rezeptors (Bande bei 180 kDa) an BT-474 Wildtypzellen [1. Spur] und nach Transfektion mit ErbB4 in den Splicevarianten (JMaCyt1 [2. Spur] und JMaCyt2 [3. Spur]).

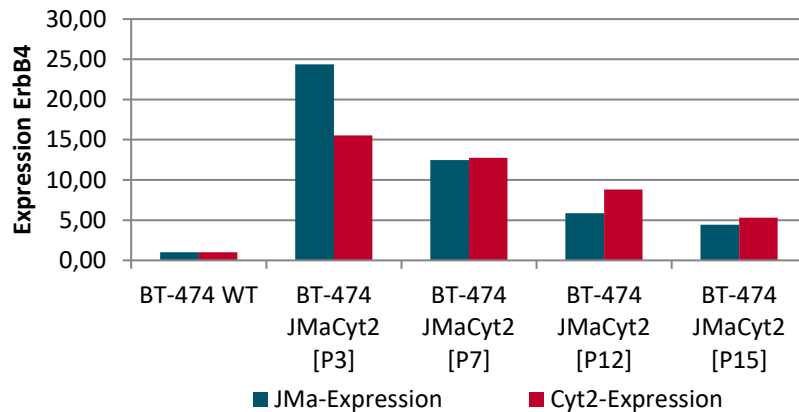
Als Korrelationskontrollen wurden die stark bzw. mittelstark Her4<sup>+</sup>-Zelllinien MCF7 [4. Spur] und ZR-75.1 [5. Spur] mitgeführt.

#### RT-PCR-Analyse

Parallel zu den Western Blot Untersuchungen wurden real-time PCR Analysen der RNA-Transkription der ErbB4-Genabschnitte durchgeführt. Diese ermöglichten darüber hinaus eine Splicevarianten-spezifische Bewertung der Transfektion.

Nachfolgend (vgl. Abb. 64) ist die RNA-Synthese von ErbB4-JMa-Cyt2 transduzierten Zellen über einen Zeitraum von 15 Zellpassagen (ca. 20 Wochen) exemplarisch dargestellt. Es zeigt sich, dass die Transfektion - entgegen anderslautender Literaturbeschreibungen - nicht vollkommen stabil ist und das Transkriptionsniveau im Zeitverlauf abnimmt. Dennoch ist das Expressionsausmaß selbst nach ca. 5 Monaten noch um den Faktor 5,9 (JMa) bzw. 8,8 (Cyt2) erhöht. Entsprechend diesem zeitabhängigen Expressionsprofil wurden - zur Sicherung eines ausreichenden Her4-Status - transfizierte Zellen nur bis Passage 10 in die unter 5.3 beschriebenen Experimente eingebracht.





**Abb. 64**  
qRT-PCR zur Splicevarianten-spezifischen Ermittlung der Her4-Expression in ErbB4-JMaCyt2 transduzierten BT-474 Zellen.

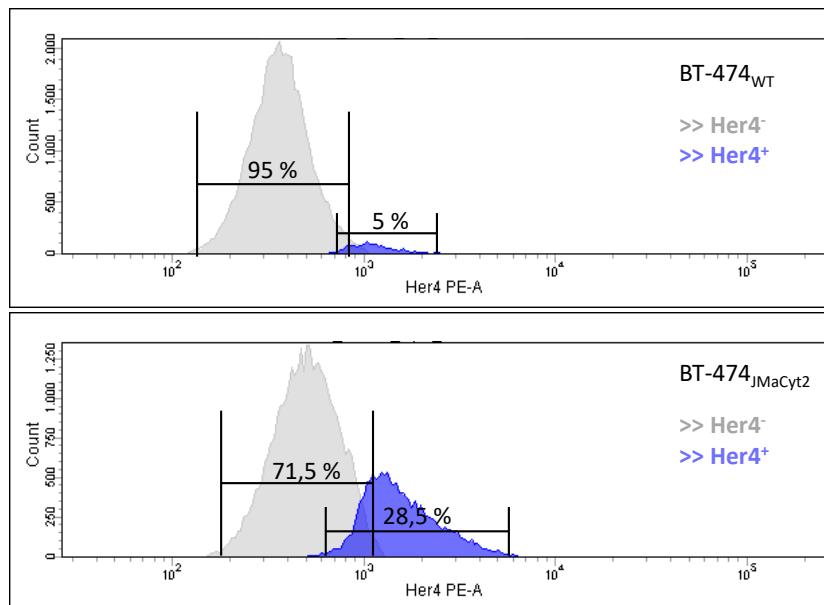
Die Ergebnisse sind als Relativwerte, normiert auf das Transkriptionsniveau der Wildtyp-Zellen (= 1,00), aufgeführt. Insgesamt wurde das Expressionsniveau über einen Zeitraum von 15 Zellpassagen [P] (ca. 20 Wochen) regelmäßig vermessen.

### FACS-Analyse

In der abschließenden Charakterisierung wurden die Zellen auch durchflusszytometrisch auf ihren Her4-Status hin untersucht. In den beiden FACS-Histogrammen der Abb. 65 sind exemplarisch jeweils eine Messung an BT-474 Wildtypzellen [oben] sowie an transduzierten Zellen [unten] dargestellt.

Die Bedeutung dieser direkten Untersuchung der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche wird insbesondere vor dem Hintergrund der weiterführenden Analysen zur Her4-Coexpression sowie für diskutierte Möglichkeit, Her4 als direkte Zielstruktur Target-spezifischer Therapeutika zu nutzen, deutlich (vgl. Kapitel 5.3).

Zusammenfassend bestätigen sich auch auf zellulärer Ebene die vorhergehend dargelegten Ergebnisse der RNA- und der Proteinebene. So führte die Her4-Transduktion zu einem Anteil von 28,5 % stark Her4<sup>+</sup>-BT-474 Zellen mit einer mittleren PE-Fluoreszenzintensität von 1729 ( $\pm$  900 SD), während die 95,0 % umfassende Her4<sup>-</sup>-Population der korrespondierenden Wildtypzellen nur eine PE-Färbung von 382 ( $\pm$  141 SD) aufwies.



**Abb. 65**  
Exemplarische durchflusszytometrische Analyse des Her4-Status von BT-474 Zellen vor und nach (semi-)stabiler ErbB4-JMaCyt2 Transduktion.

Vergleichbare Untersuchungen an ErbB4-JMaCyt1 transduzierten Zellen wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit nicht durchgeführt, da sich für diese Gen keine stabile Transfektionsprotokoll etablieren ließ.

### 5.3.2.1 Einfluss einer Her4-Coexpression auf eine Therapie mit dem selektiven Östrogen-Rezeptor-Modulator Tamoxifen

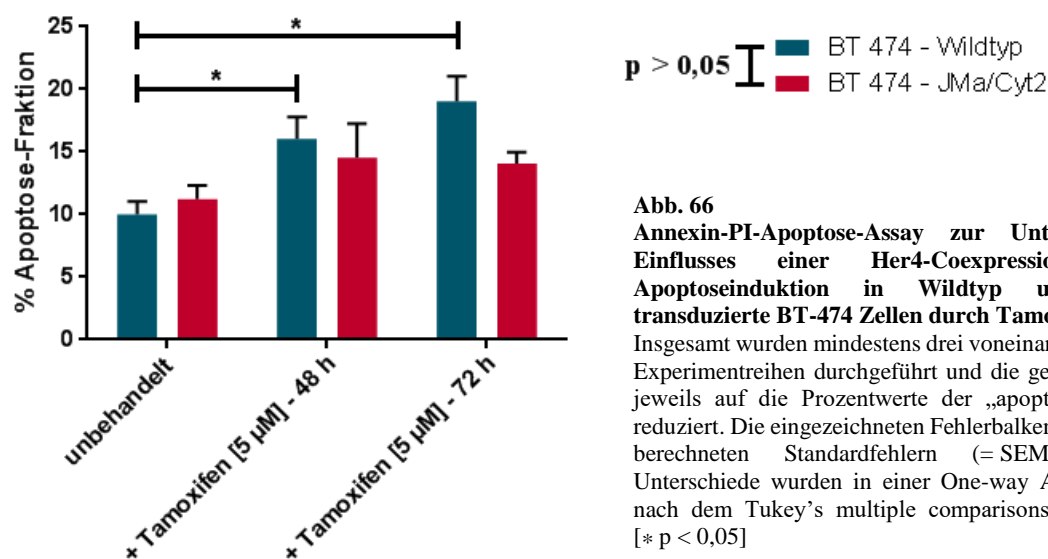
Die Wildtyp und die transduzierten BT-474 Zellen wurden mit dem anti-Her2-spezifischen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab (vgl. Kapitel 5.3.2.3), dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (vgl. Kapitel 5.3.2.2) sowie dem Estrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen behandelt, um in Abhängigkeit einer Her4-Rezeptor-Coexpression eine ggf. unterschiedliche Proliferations- und Metabolismuskinetik sowie die potentielle Apoptoseinduktion zu vermessen. Auf diese Weise gelang die Analyse des Einflusses der Her4-Rezeptoren auf das Potential dieser Target-spezifischen Tumortherapeutika.

Von diesen Ergebnissen können letztlich Rückschlüsse auf die wechselseitigen molekularen Interaktionen von Her2, Her4 und dem Östrogenrezeptor (ER) gezogen und konsekutiv ihr Einfluss auf die Effizienz von anti-Her2 bzw. anti-ER Behandlungen abgeschätzt werden.

#### Annexin-V-FITC-Apoptose-Assay

Der Annexin-V-FITC-Apoptose-Assay ermöglicht die durchflusszytometrische Bestimmung jener Zellpopulation, in der behandlungsbedingt Apoptose induziert wurde. Nachfolgende Ergebnisse stellen den induzierten Zelltod in BT-474 Wildtypzellen dem in JMaCyt2-transduzierten Zellen gegenüber. Dies ermöglicht Aussagen über den prädiktiven Therapieerfolg einer Tamoxifen-Behandlung in Abhängigkeit einer ErbB4-JMaCyt2-Coexpression.

Als Kontrollansätze dienten unbehandelt Zellen. Camptothecin bzw.  $\text{NaN}_3$  wurde den Zellen als positiv Kontrollen zugegeben, da sie durch die Blockade der Topoisomerase I bzw. der zellulären Atmungskette zu starken Apoptosesignalen in den Versuchen führen.



**Abb. 66**  
 Annexin-PI-Apoptose-Assay zur Untersuchung des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Apoptoseinduktion in Wildtyp und JMaCyt2-transduzierte BT-474 Zellen durch Tamoxifen.

Insgesamt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimentreihen durchgeführt und die gewonnenen Daten jeweils auf die Prozentwerte der „apoptotischen Zellen“ reduziert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer One-way ANOVA Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet. [\*  $p < 0,05$ ]

Die Negativkontrolle der BT-474<sub>Wildtyp</sub> Zellen [Abb. 66, dunkelblaue Balken] enthalten im unbehandelten Ansatz eine Apoptosefraktion von 10,0 % ( $\pm 1,0$  %). Mit der Zugabe von Tamoxifen kommt es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 48 bzw. 72 Stunden zu einer statistisch signifikanten Induktion der Apoptose auf 16,1 % ( $\pm 1,7$  %) bzw. 19,1 % ( $\pm 2,0$  %) mit einem p-Wert von jeweils  $p < 0,05$ .

Mit der Transfektion des Her4 Rezeptors ergibt sich für die unbehandelte Kontrolle [magenta Balken] nur ein geringer, nicht signifikanter ( $p > 0,05$ ) Unterschied zu den Wildtypversuchen. Entsprechend befinden sich 11,3 % ( $\pm 1,1$  %) dieser Zellen im natürlichen Zelltod. Die Applikation von Tamoxifen führt hier allerdings zu einer nicht signifikanten Zunahme der apoptotischen Fraktion auf 14,6 % ( $\pm 2,7$  %) [48 h] bzw. 14,1 % ( $\pm 0,9$  %) [72 h]. Vor diesem Hintergrund lässt sich schlussfolgern, dass der ErbB4-Rezeptor zu einer Desensibilisierung gegenüber einem Tamoxifentreatment führt.

## Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen: S-Phase-Fraktion- und BrdU-Assay

### SPF-Assay

Der Therapieerfolg der klinisch zugelassen Target-spezifischen Tamoxifentherapie des Mammakarzinoms beruht neben der Apoptoseinduktion insbesondere auf einer Hemmung der Zellproliferation. Um diesen antiproliferativen Effekt zu quantifizieren und einen möglichen Einfluss einer Coexpression des Her4-Rezeptors hierauf zu evaluieren, wurde sowohl statische durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse zur Ermittlung der S-Phase-Fraktion durchgeführt als auch die dynamische BrdU/Hoechst-Quenching-Technik angewendet.

Die unbehandelten Kontrollansätze zeigen eine Her4-Transduktionsunabhängige Proliferation. Entsprechend beträgt die Zellfraktion in der S-Phase im BT-474<sub>Wildtyp</sub>-Ansatz 34,7 % ( $\pm 1,0$  %) [Abb. 67, dunkelblaue Balken] und im BT-474<sub>JMaCyt2</sub>-Ansatz 35,5 % ( $\pm 0,7$  %) [Abb. 67, magenta Balken]. Tamoxifen wirkt auf beide BT-474 Populationen signifikant proliferationshemmend. Bei BT-474 Wildtypzellen lässt sich die SPF nach 48- bzw. 72-stündigen Behandlung bei 13,5 % ( $\pm 0,7$  %) bzw. 16,8 % ( $\pm 1,7$  %) vermessen. Nach Her4-Transduktion beträgt sie hingegen 11,6 % ( $\pm 0,7$  %) bzw. 12,7 % ( $\pm 0,5$  %).

In der Two-way ANOVA Bewertung der beiden Zelllinien bestätigt sich damit die ausgesprochene wachstumshemmende Wirkung von Tamoxifen, es lässt sich jedoch keine Her4-Abhängigkeit berechnen ( $p = 0,19$ ).

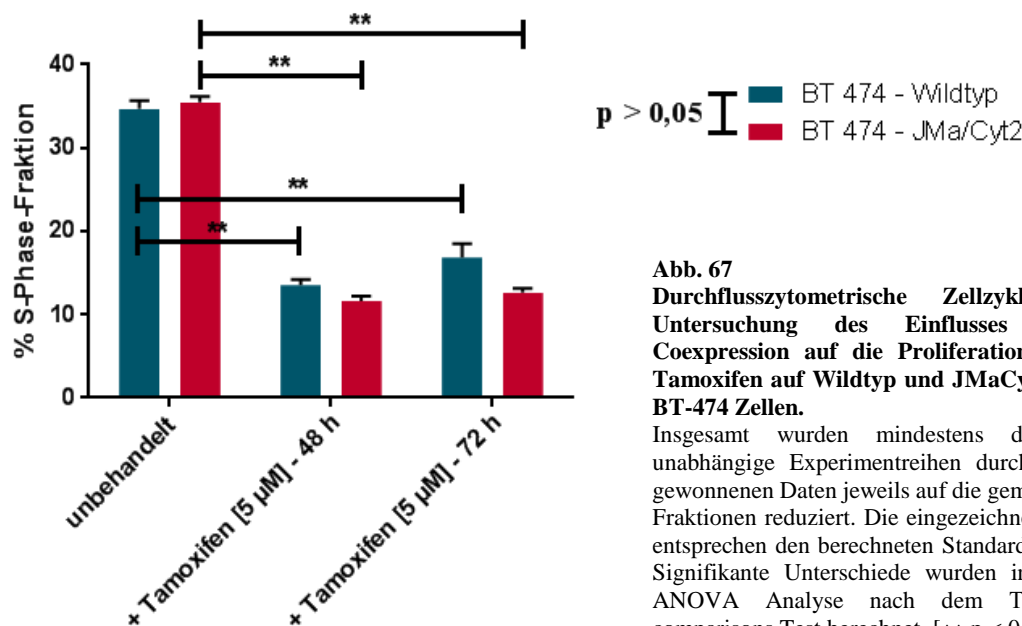


Abb. 67

**Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse zur Untersuchung des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Proliferationshemmung von Tamoxifen auf Wildtyp und JMaCyt2-transduzierte BT-474 Zellen.**

Insgesamt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimentreihen durchgeführt und die gewonnenen Daten jeweils auf die gemessenen S-Phase-Fractionen reduziert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer One-way ANOVA Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet. [\*\*  $p < 0,01$ ]

### BrdU-Assay

Als dynamischer Proliferationsassay erlaubt die BrdU-Quenching-Technik, sensitiver als obiges Untersuchungsverfahren, die Zellfraktion zu bestimmen, die durch die Therapie in die Ruhephase G0 übertritt.

Als Negativkontrollen dienten Probenansätze, die in identischer Weise mit BrdU markiert wurden, jedoch kein Therapeutikum zu gesetzt bekamen. Insgesamt wurden die Zellen für 96 Stunden therapiert. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Abbildung 68 zusammengefasst.

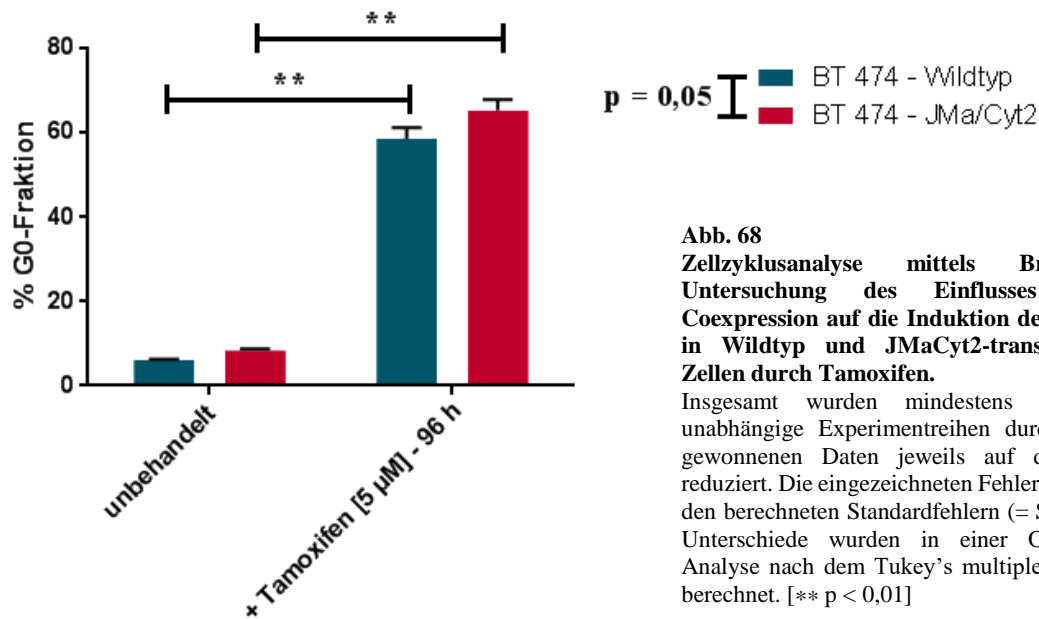


Abb. 68

**Zellzyklusanalyse mittels BrdU-Assay zur Untersuchung des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Induktion der G0-Zellfraktion in Wildtyp und JMaCyt2-transduzierte BT-474 Zellen durch Tamoxifen.**

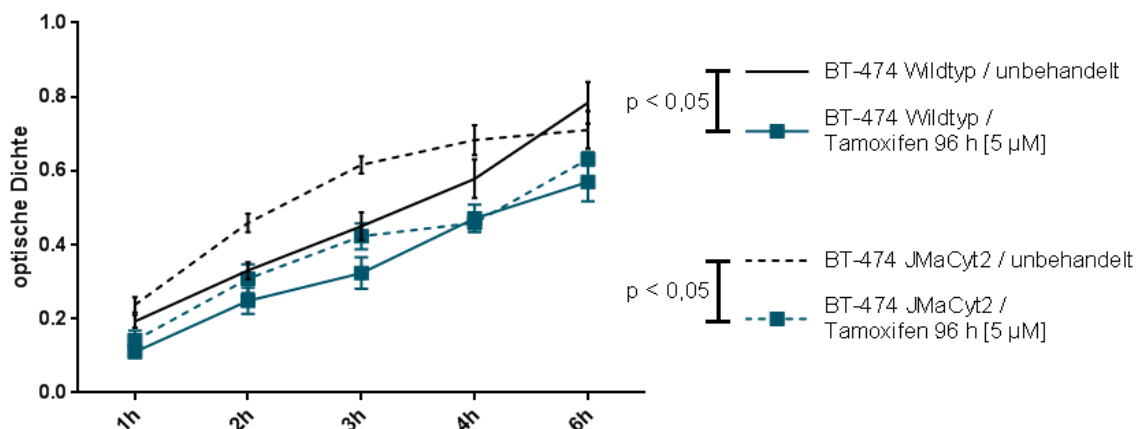
Insgesamt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimentreihen durchgeführt und die gewonnenen Daten jeweils auf die G0-Fractionen reduziert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer One-way ANOVA Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet. [\*\*  $p < 0,01$ ]

Der Zellanteil in der G0-Phase von 6,1 % ( $\pm 0,2$  %) bei BT-474<sub>Wildtyp</sub> Zellen [dunkelblaue Balken] und 8,4 % ( $\pm 0,4$  %) bei BT-474<sub>JMaCyt2</sub> Zellen steigt bei beiden Zellarten signifikant nach Applikation von Tamoxifen an. Dabei nimmt diese Zellpopulation bei den natürlichen Zellen um den Faktor 9,6 auf 58,5 % ( $\pm 2,6$  %) zu, während er bei den veränderten Zellklonen nur um den Faktor 7,8 auf 65,2 % ( $\pm 2,5$  %) steigt.

In der Two-way ANOVA Bewertung der beiden Zelllinien bestätigt sich der signifikante Einfluss der Tamoxifen-Behandlung. Außerdem lässt sich, trotz der geringen absoluten Unterschiede, knapp ein signifikanter Einfluss der ErbB4-Transduktion auf die Tamoxifensensitivität der Zellen berechnen ( $p = 0,05$ ).

### XTT-Metabolismus-Assay

Während die vorangegangenen Untersuchungen die Rolle des Her4-Rezeptors bzgl. proliferationshemmender und apoptoseinduzierender Effekte Target-spezifischer Therapien analysierten, ermöglicht der XTT-Assay Aussagen über die Zellvitalität und v. a. über den Zellmetabolismus (vgl. auch Kapitel 4.3).



**Abb. 69 Exemplarische Darstellung eines von drei unabhängigen XTT-Assays zur Analyse des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Metabolismusbeeinflussung von Wildtyp und JMaCyt2-transduzierten BT-474 Zellen durch Tamoxifen.** Die an der y-Achse aufgetragene optische Dichte entspricht der Differenz aus dem photometrischen Messwert und einem Mediumleerwert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer Two-way ANOVA Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet.

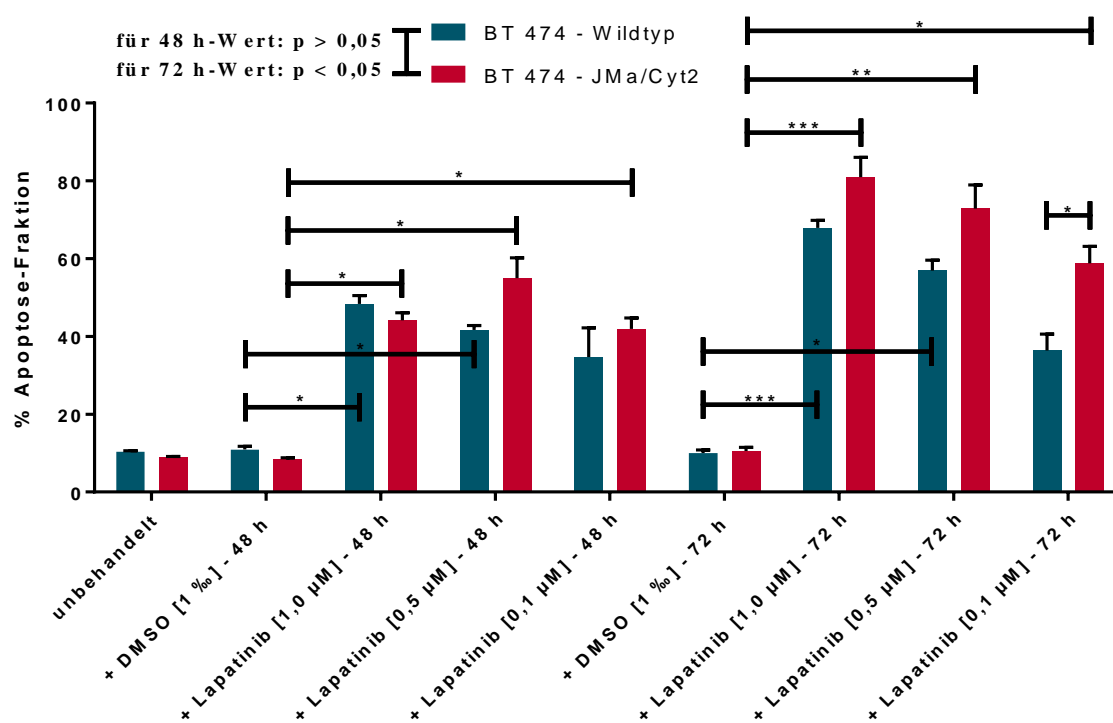
In den Kontrollansätzen [schwarze Kurven] zeigen die ausgesäten BT-474 Zellen unabhängig von einer ggf. vorhandenen Her4-Coexpression einen signifikanten und in etwa vergleichbaren Umsatz der XTT-Lösung. Die Zugabe von Tamoxifen [dunkelblaue Kurven] führt bei beiden Zellarten zur signifikanten Reduktion des zellulären Metabolismus ( $p < 0,05$ ).

### 5.3.2.2 Einfluss einer Her4-Coexpression auf eine Therapie mit dem dualen EGFR/Her2 Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib

#### Annexin-V-FITC-Apoptose-Assay

Der mögliche Einfluss einer Her4-Coexpression auf eine Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib wurde in einem zweiten Schritt untersucht. Für Aussagen bzgl. einer Lapatinib-abhängigen Apoptoseinduktion diente erneut der durchflusszytometrische Annexin-V-FITC-Assay an Wildtyp- und JMaCyt2-transduzierten BT-474 Zellen.

Dem Balkendiagramm 70 können die Untersuchungsergebnisse entnommen werden, wobei als Kontrollansätze hierbei Zellen verwendet wurden, denen nur das Lösungsmittel DMSO zugesetzt wurde.



**Abb. 70 Annexin-PI-Apoptose-Assay zur Untersuchung des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Apoptoseinduktion in Wildtyp und JMaCyt2-transduzierte BT-474 Zellen durch Lapatinib.** Insgesamt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimentreihen durchgeführt und die gewonnenen Daten jeweils auf die Prozentwerte der „apoptotischen Zellen“ reduziert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer One-way ANOVA Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ausgewählte Varianzen vermerkt sind. Als Berechnungsgrundlage diente jeweils ein Kontrollansatz, dessen Zellen lediglich das Lösungsmittel DMSO zugesetzt wurde. [ $* p < 0,05$ ;  $** p < 0,01$ ;  $*** p < 0,001$ ]

Die unbehandelten Negativkontrollen der BT-474<sub>Wildtyp</sub> Zellen [vgl. Abb. 70, dunkelblaue Balken] enthalten eine Apoptosefraktion von 10,4 % ( $\pm 0,22$  %). Mit Zugabe des Lösungsmittels DMSO steigt dieser Anteil nicht signifikant auf 10,9 % ( $\pm 0,80$  %). Mit der Transfektion des Her4-Rezeptors ergeben sich für die unbehandelte sowie für die DMSO-Kontrolle [vgl. Abb. 70, magenta Balken] nur geringe, nicht signifikante Unterschiede zu den Wildtypversuchen (One-way ANOVA:  $p > 0,05$ ).

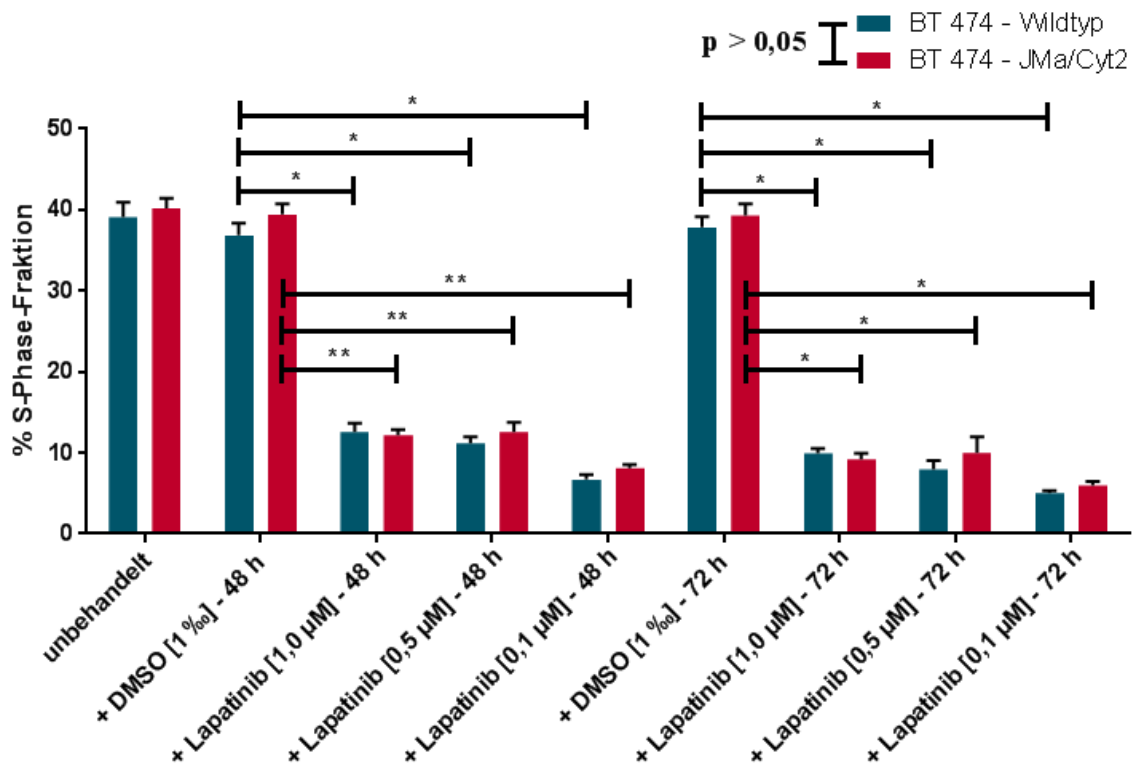
Eine Lapatinibtherapie führt bei beiden Zellarten zu einer statistisch signifikanten Induktion der Apoptose, wobei sich sowohl eine Konzentrations- als auch eine Her4-Abhängigkeit zeigt. Während bei den Wildtypzellen nur eine Lapatinibkonzentration von mindestens 0,5 µM den Anteil der vitalen Zellen signifikant reduziert, reicht bei den transduzierten Zellen mit 0,1 µM bereits ein Fünftel dieser Menge. Zudem ist auch die absolute Abnahme bei letzterer Zellpopulation deutlich ausgeprägter. So nimmt die Apoptosefraktion bei BT-474<sub>Cyt2</sub> Zellen, abhängig von der Konzentration des Tyrosinkinaseinhibitors, um bis zu 770 % zu, während sich für die BT-474<sub>WT</sub> Zellen lediglich eine 6,8-fachen Zunahme des Anteils an toten Zellen herausarbeiten lässt (One-way ANOVA:  $p < 0,05$ ).

Zusammenfassend kann somit die JMaCyt2-Transfektion mit einer gesteigerten Sensitivität gegenüber Lapatinib in Zusammenhang gebracht werden, was sich für die 72 Stunden behandelten Ansätze nach Two-Way ANOVA auch mit einer Varianz von  $p < 0,05$  berechnen lässt.

### Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen: S-Phase-Fraktion- und BrdU-Assay

#### SPF-Assay

Lapatinib besitzt neben seinem apoptoseinduzierenden Potential die Eigenschaft, die Zellproliferation durch eine intrazelluläre Blockade der EGFR- bzw. Her2-assoziierten Signaltransduktion zu hemmen (vgl. Kapitel 1.4.2). Zur Quantifizierung dieser Möglichkeit der Tumorzellhemmung - ggf. in Abhängigkeit einer vorhandenen Her4-Coexpression - wurden erneut durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen als S-Phase-Fraktionsassay bzw. in dynamischer BrdU/Hoechst-Quenching-Technik eingesetzt.



**Abb. 71 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse zur Untersuchung des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Proliferationshemmung von Lapatinib auf Wildtyp und JMaCyt2-transduzierte BT-474 Zellen.** Insgesamt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimentreihen durchgeführt und die gewonnenen Daten jeweils auf die gemessenen S-Phase-Fractionen reduziert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer One-way ANOVA Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet, wobei aus Gründen der Übersichtlichkeit nur ausgewählte Varianzen vermerkt sind. Als Berechnungsgrundlage diente jeweils ein Kontrollansatz, dessen Zellen lediglich das Lösungsmittel DMSO zugesetzt wurde. [\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ]

Als Negativkontrollen dienten jeweils Versuchsansätze, die in reinem Kulturmedium ausgesät bzw. nur mit DMSO behandelt wurden. Die letztgenannten Proben dienten zudem als statistischer Ausgangswert für die Lapatinib-versetzten Zellen, da DMSO als Lösungsmittel für diesen Tyrosinkinaseinhibitor verwendet wurde. Zusammengefasst lässt sich - wie in Abbildung 71 graphisch verdeutlicht - kein signifikanter Einfluss einer Her4-Transduktion vermessen.

Lapatinib wirkt signifikant proliferationshemmend auf die BT-474 Zellen. Sowohl nach einer zwei- als auch drei-tägigen Behandlung reduziert sich konzentrationsabhängig die proliferierende Zellfraktion. In der Two-way ANOVA Bewertung der beiden Zelllinien bestätigt sich zwar die ausgesprochene wachstumshemmende Wirkung von Lapatinib, es lässt sich jedoch keine Her4-Abhängigkeit berechnen ( $p = 0,27$ ). Auch in der

getrennten Analyse der beiden Untersuchungszeiträume konnte kein signifikanter Einfluss einer Her4-Transduktion berechnet werden.

### BrdU-Assay

Mammakarzinomzellen, die in identischer Weise mit BrdU markiert wurden, jedoch kein Therapeutikum - mit Ausnahme von DMSO als Lösungsmittelkontrolle - zu gesetzt bekamen, wurden als Basiswert vermessen. Hierbei führte die Lösungsmittelzugabe nur zu einem minimalen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der ruhenden Zellen. Der spezifische Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib erhöht bei beiden Zellvarianten signifikant die Zellpopulation in der G0-Phase. Bei den unveränderten Zellen steigt dieser Anteil um den Faktor 9,2 von 8,5 % ( $\pm 0,35$  %) auf 78,5 % ( $\pm 4,5$  %), während er nach Her4-Transduktion nur um den Faktor 8,1 von 10,5 % ( $\pm 0,34$  %) auf 84,6 % ( $\pm 1,0$  %) zunimmt. In der Two-way ANOVA Bewertung der beiden Zelllinien bestätigt sich der signifikante Einfluss der Lapatinibbehandlung. Einen signifikanten Unterschied konnte jedoch nicht in Abhängigkeit der Anwesenheit des Her4-Rezeptors nachgewiesen werden.

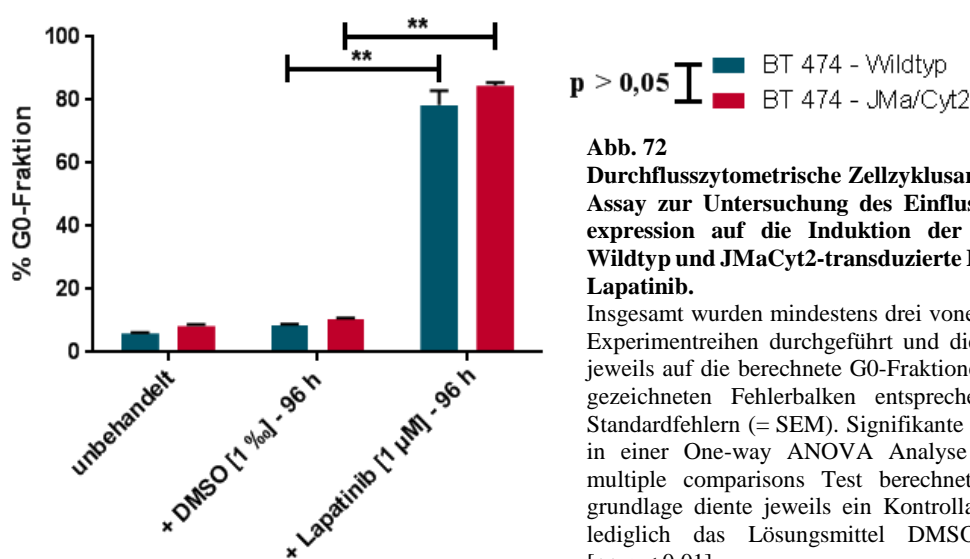


Abb. 72

**Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse mittels BrdU-Assay zur Untersuchung des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Induktion der G0-Zellfraktion in Wildtyp und JMaCyt2-transduzierte BT-474 Zellen durch Lapatinib.**

Insgesamt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimentreihen durchgeführt und die gewonnenen Daten jeweils auf die berechnete G0-Fractionen reduziert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer One-way ANOVA Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet. Als Berechnungsgrundlage diente jeweils ein Kontrollansatz, dessen Zellen lediglich das Lösungsmittel DMSO zugesetzt wurde. [\*\*  $p < 0,01$ ].

### XTT-Metabolismus-Assay

Als dritter zellulärer Parameter diente erneut die Einflussnahme auf den zellulären Metabolismus zur Bewertung des möglichen Einflusses einer zusätzlichen Her4-Expression.

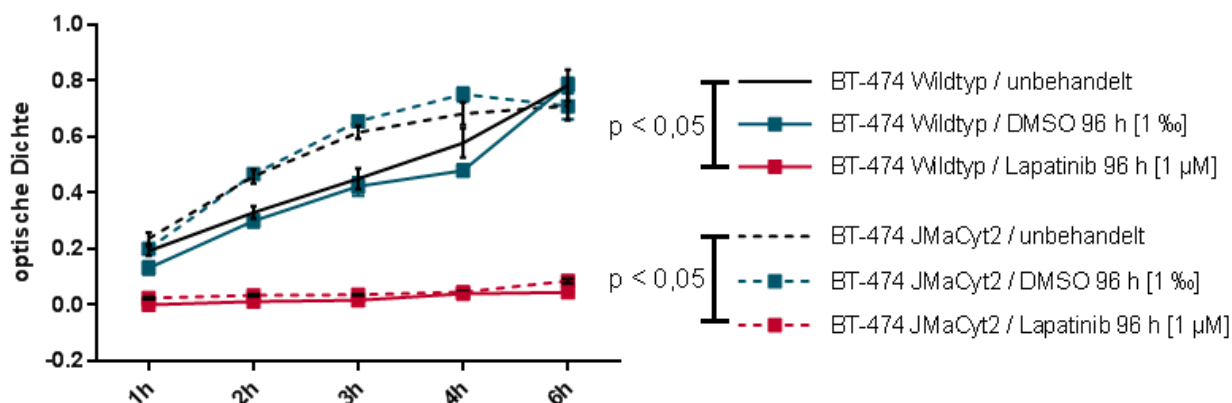


Abb. 73 Exemplarische Darstellung eines von drei unabhängigen XTT-Assays zur Analyse des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Metabolismusbeeinflussung von Wildtyp und transduzierten BT-474 Zellen durch den Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib. Die an der y-Achse aufgetragene optische Dichte entspricht der Differenz aus dem photometrischen Messwert und einem Mediumleerwert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer Two-way ANOVA Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet.

Die optische Dichte der mit DMSO inkubierten Kontrollzellen unterschied sich nicht signifikant von den unbehandelten Zellen. Die Zugabe von Lapatinib führt bei beiden Zellarten zu massiven Einschränkung des



zellulären Metabolismus. Einen Unterschied zwischen den BT-474<sub>WT</sub> bzw. BT-474<sub>Cyt2</sub> Zellen ist jedoch nicht nachweisbar.

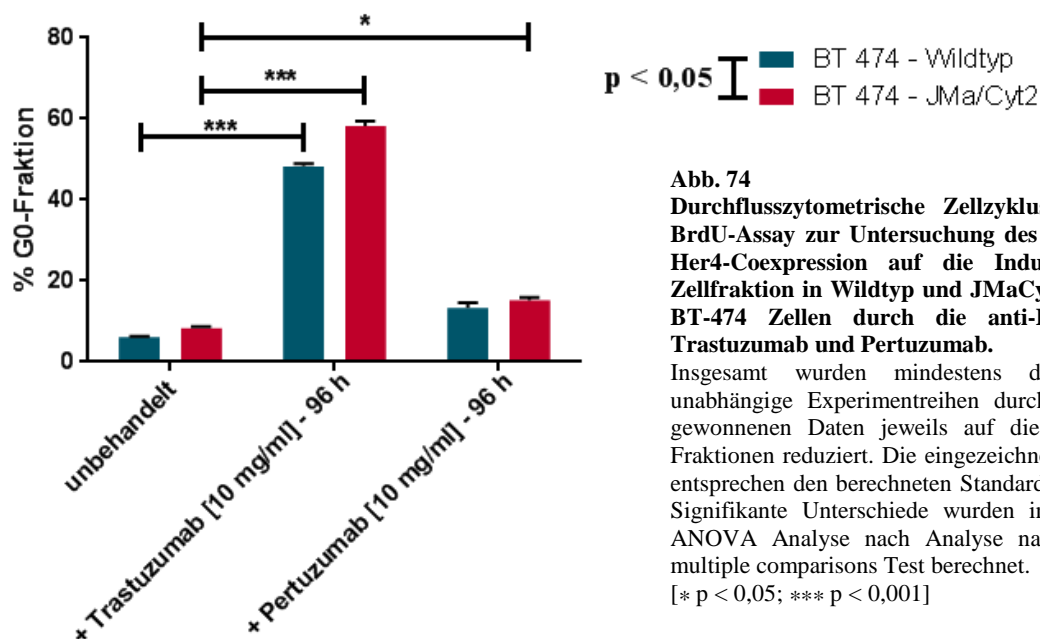
### 5.3.2.3 Einfluss einer Her4-Coexpression auf eine Therapie mit den monoklonalen anti-Her2-Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab

Als dritten Target-spezifischen Therapieansatz wurde die monoklonalen anti-Her2-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab auf ihr Her4-abhängiges Wirkpotential evaluiert. Da sich aus den beschriebenen Untersuchungen (vgl. 5.1 und 5.2) keine signifikante, direkte Apoptoseinduktion ableiten lässt, beschränkt sich dieser Abschnitt auf die proliferations- und metabolismushemmenden Eigenschaften dieser Antikörper in An- bzw. Abwesenheit des ErbB4-Rezeptors.

#### Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse: BrdU-Assay

Wie u. a. aus den in Kapitel 5.1.1 dargestellten Daten hervorgeht, resultiert die tumorsuppressive Wirkung der anti-Her2-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab zu einem großen Anteil aus ihren proliferationshemmenden Eigenschaften. Da mehrere klinische Beobachtungen die These nahelegen, dass eine zusätzliche Her4-Expression die Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit diesen monoklonalen Antikörpern beeinflussen könnte, wurden erneut BT-474<sub>Wildtyp</sub> Zellen und ihre JMaCyt2-transduzierten Klone in einem BrdU-Assay auf ihr Ansprechen vermessen.

In den unbehandelten Kontrollen befinden sich von den BT-474 Zellen 6,1 % ( $\pm 0,2$  %) [vgl. Abb. 74, WT, dunkelblaue Balken] bzw. 8,4 % ( $\pm 0,4$  %) [vgl. Abb. 74, JMa/Cyt2, magenta Balken] in der Go-Phase. Mit Zugabe von Trastuzumab steigt dieser Anteil bei beiden Zellarten höchst signifikant auf 48,3 % ( $\pm 0,6$  %) bzw. 58,2 % ( $\pm 1,2$  %) an ( $p < 0,001$ ). Bei einem absoluten Unterschied von ca. 10 Prozentpunkten berechnet sich auch nach Two-way ANOVA ein signifikanter Einfluss der Her4-Expression auf die Trastuzumabsensitivität ( $p = 0,04$ ). Bei Pertuzumab führt eine eingeführte Her4-Coexpression ebenfalls zu einer signifikanten Sensitivitätssteigerung: Während die Wildtypzellen zwar ebenfalls in ihrer Proliferation gehemmt werden (G0-Anteil: 12,3 % ( $\pm 1,4$  %)), ergibt sich nur nach Her4-Transduktion eine signifikante Steigerung des Anteils an ruhenden Zellen auf 15,2 % ( $\pm 0,7$  %).



**Abb. 74**

**Durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse mittels BrdU-Assay zur Untersuchung des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Induktion der G0-Zellfraktion in Wildtyp und JMaCyt2-transduzierte BT-474 Zellen durch die anti-Her2-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab.**

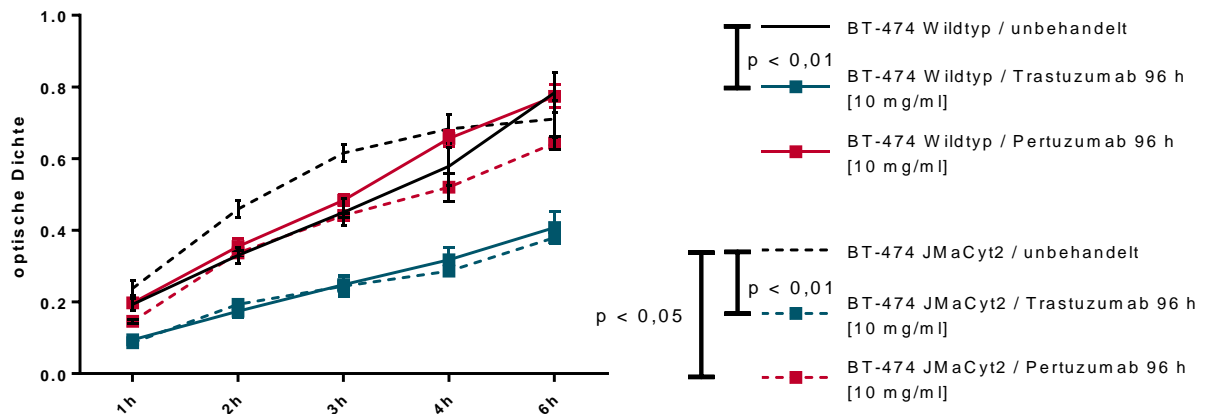
Insgesamt wurden mindestens drei voneinander unabhängige Experimentreihen durchgeführt und die gewonnenen Daten jeweils auf die berechnete G0-Fractionen reduziert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer One-way ANOVA Analyse nach Analyse nach dem Tukey's multiple comparisons Test berechnet.

[\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ]



### XTT-Metabolismus-Assay

Abschließend soll im Folgenden eine mögliche Auswirkung einer Her4-Coexpression auf das Ansprechen von BT-474 Zellen auf eine Trastuzumab- bzw. Pertuzumab-Therapie auf Metabolismusebene charakterisiert werden.



**Abb. 75 Exemplarische Darstellung eines von drei unabhängigen XTT-Assays zur Analyse des Einflusses einer Her4-Coexpression auf die Metabolismusbeeinflussung von Wildtyp und JMaCyt2-transduzierten BT-474 Zellen durch anti-Her2-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab.** Die an der y-Achse aufgetragene optische Dichte entspricht der Differenz aus dem photometrischen Messwert und einem Mediumleerwert. Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den berechneten Standardfehlern (= SEM). Signifikante Unterschiede wurden in einer Two-way ANOVA Analyse nach Tukey multiple comparisons Test berechnet.

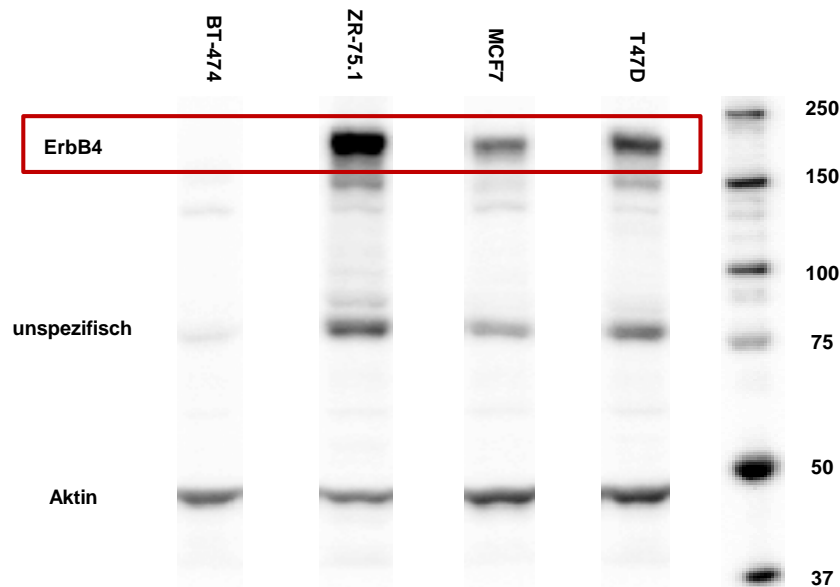
Auch bzgl. des zellulären Stoffwechsels führt Trastuzumab bei beiden Zellarten zu einer signifikanten Reduktion. Pertuzumab bewirkt dies hingegen lediglich bei den Her4-transduzierten BT-474<sub>JMaCyt2</sub> Zellen.

Da sich auch in der statistischen Betrachtung nach Two-way ANOVA der Einfluss der therapeutischen Antikörper in Anwesenheit des Her4-Rezeptors als stärker ausgeprägt darstellt, scheint seine Expression einen positiven Effekt für das Ansprechen v. a. von Pertuzumab zu induzieren.

### 5.3.3 ErbB4-Expressionsprofil der untersuchten Zelllinien

In den folgenden Kapiteln soll die therapeutische Wirksamkeit des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479 untersucht werden. Hierzu wurde zunächst das ErbB4-Expressionsprofil der untersuchten Zelllinien sowohl auf Proteinebene als auch auf zellulärer Ebene näher charakterisiert.

#### Proteinebene im Western Blot



**Abb. 76**  
**Western Blot zur qualitativen Ermittlung des ErbB4-Expressionsprofils.**  
Untersucht wurden jeweils die stark Her4<sup>+</sup>-Zelllinien ZR-75.1, MCF7 und T47D. Die annähernd Her4-negative BT-474 Zellen diente als korrelierende Kontrolle.

In der Abbildung 76 wird exemplarisch die Her4-Expression auf Proteinebene der untersuchten Zelllinien ZR-75.1, MCF7 und T47D dargestellt. Es ist ersichtlich, dass alle drei Mammarkarzinomzelllinien Her4 exprimieren, wobei die ZR-75.1 Zellen die stärksten Banden bei einem Molekulargewicht von 180 kDa und somit die höchste Expression aufweisen. Als korrelierende annähernd Her4<sup>-</sup>-Zelllinie wurde BT-474 mitgeführt. Über die als Lauf- und Ladekontrolle eingesetzten  $\beta$ -Aktin-Banden (~ 42 kDa), die in allen Spuren mit etwa gleicher Stärke nachgewiesen wurden, wurde die relative Vergleichbarkeit zwischen den untersuchten Zelllinien sichergestellt.

#### Zelluläre Ebene im FACS

Entscheidend für die Interaktion des Antikörpers mit dem korrespondierenden Antigen ist dessen Expression auf der Zelloberfläche, da es nur so zur direkten Ak-Ag-Bindung kommen kann. Daher wurden im Nachgang an die Analysen auf Proteinebene durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 77 dargelegt. Hier bestätigt sich der hohe Gehalt des Wachstumsrezeptors Her4 auf der Zelloberfläche aller drei untersuchten Zelllinien, während er nur sehr gering auf der Kontrollzelllinie BT-474 (vgl. Abb. 78) nachweisbar war. Auch in der Quantifizierung korrelieren die FACS-Untersuchungen bzgl. der Stain-Indizes mit den densitometrisch quantifizierten Proteinmengen aus Graphik 76. Mit einem Stain-Index von 16,03 besitzen ZR-75.1-Zellen deutlich ausgeprägter ErbB4, als die beiden übrigen Mammazellen (MCF7: 8,89; T47D: 5,93).

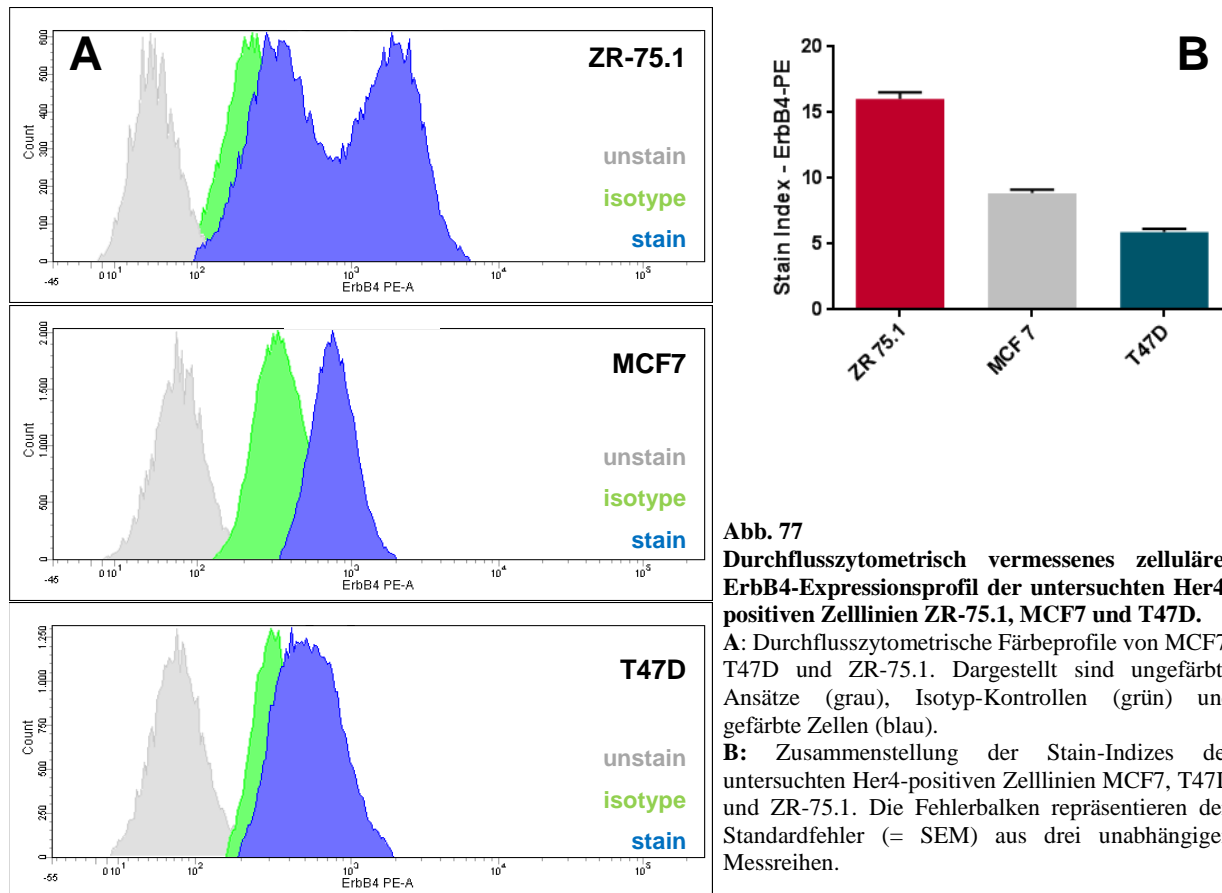


Abb. 77

**Durchflusszytometrisch vermessenes zelluläres ErbB4-Expressionsprofil der untersuchten Her4-positiven Zelllinien ZR-75.1, MCF7 und T47D.**

**A:** Durchflusszytometrische Färbepprofile von MCF7, T47D und ZR-75.1. Dargestellt sind ungefärbte Ansätze (grau), Isotyp-Kontrollen (grün) und gefärbte Zellen (blau).

**B:** Zusammenstellung der Stain-Indizes der untersuchten Her4-positiven Zelllinien MCF7, T47D und ZR-75.1. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (= SEM) aus drei unabhängigen Messreihen.

Im Histogramm 78 werden die FACS-Ergebnisse zum ErbB4-Expressionsniveau der annähernd Her4-negativen Zelllinie BT-474 (orange) graphisch zusammengestellt. Unter Berücksichtigung der logarithmischen Auftragung bestätigt sich im Vergleich zu ZR-75.1, MCF7 bzw. T47D der deutlich geringere Her4-Gehalt dieser Zellen. In Anknüpfung an die in Kapitel 5.3.2 ausführlich diskutierten Untersuchungen zur retroviralen Transfektion dieser Zelllinie mit dem Her4-Isotype JMaCyt2 erfolgte auch an dieser Zellpopulation die durchflusszytometrische Ermittlung des Her4-Status. Die entsprechenden Messwerte wurden in blau ebenfalls in Abbildung 78 eingefügt.

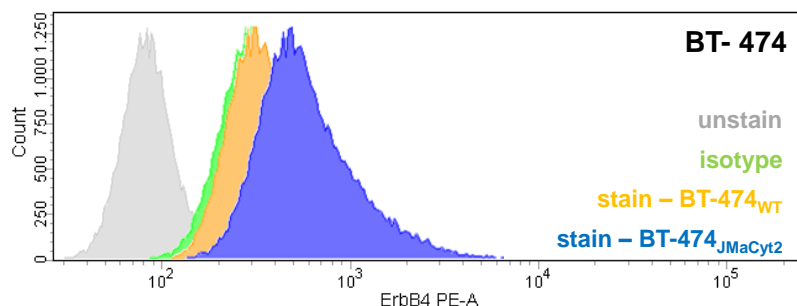


Abb. 78

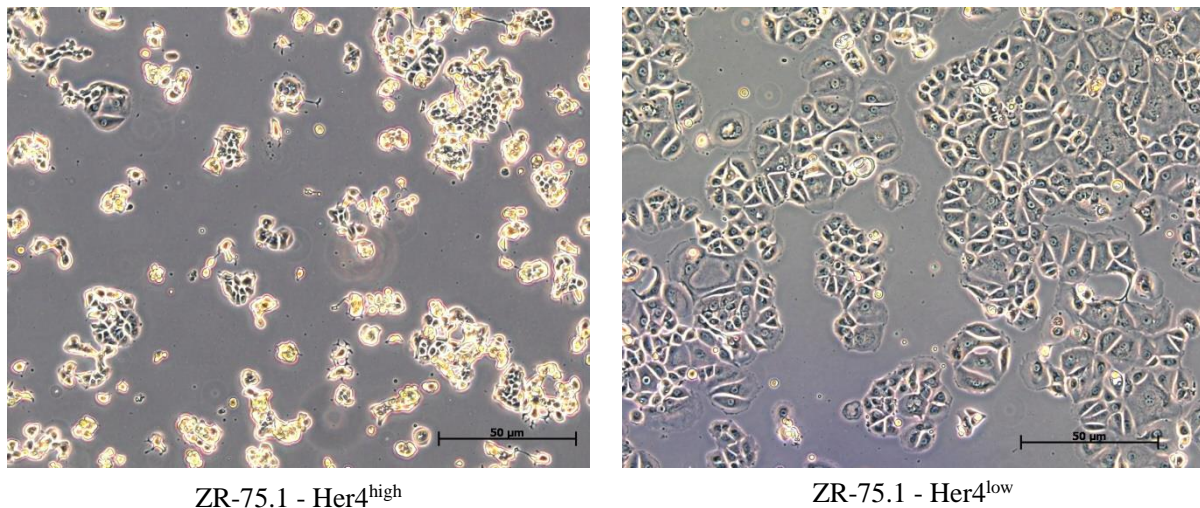
**Durchflusszytometrisch vermessenes zelluläres ErbB4-Expressionsprofil der annähernd Her4-negativen Zelllinie BT-474<sub>WT</sub> (orange) und der Her4 (JMaCyt2) -transfizierten Zelllinie BT-474<sub>Cyt2</sub>.** Dargestellt sind ungefärbte Ansätze (grau), Isotyp-Kontrollen (grün) sowie die gefärbten BT-474<sub>WT</sub> (orange) bzw. transfizierten BT-474<sub>JMaCyt2</sub> (blau) Zellen.

**Einschub:**

Unerwarteter Weise wiesen die ZR-75.1 Zellen in der FACS-Untersuchung zur Her4-Expression (vgl. Abb. 77A, oben) ein heterogenes Profil auf. So zeigten sich zwei annähernd gleich große Subpopulationen, wobei eine davon eine deutlich stärkere Erb4-Expression besitzt. Weiterführende Analysen dieser Zelllinie ergaben, dass es sich trotz phänotypisch heterogenem Her4-Expressionsprofil um genetisch homogene Zellen handelt. Eine kommerzielle nonaplex PCR-Untersuchung von Short Tandem Repeats (STRs) bestätigte die Authentizität der Zellen gegenüber Referenzen der ursprünglichen ATCC-Zelllinie und schloss eine anderweitige Kontamination aus.

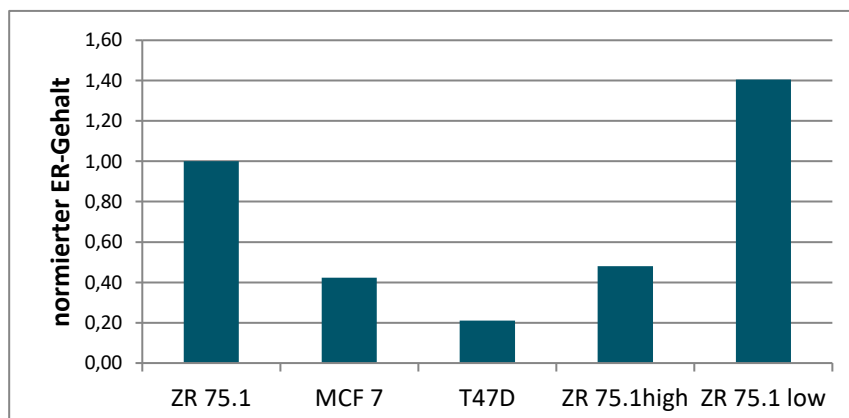
Eine durchflusszytometrische Sortierung der Zellen entsprechend dem Her4-Gehalt in eine Her4<sup>high</sup>- sowie eine Her4<sup>low</sup>-Subpopulation wurde durchgeführt. Über einen Zeitraum von 5 Passagen wurde das verschiedene Expressionsniveau verfolgt. Es ergaben sich lediglich geringe Angleichungstendenzen zurück zur ursprüngliche Mischpopulation- bzw. Doppelpeakpopulation.

Mikroskopisch zeigten beide Zellklassen zudem deutliche morphologische Unterschiede. Die ZR-75.1-Her4<sup>low</sup>-Zellen waren deutlich größer und stärker granuliert als die Zellklone mit hohem Her4-Level (vgl. Abb. 79).



**Abb. 79** Nativ-mikroskopische Aufnahmen von Kulturen der Zelllinien ZR-75.1-Her4<sup>high</sup> (links) sowie ZR-75.1-Her4<sup>low</sup> (rechts) zur morphologischen Beurteilung. Die ZR-75.1-Her4<sup>low</sup>-Zellen waren im Vergleich zu den Zellklonen mit hohem Her4-Level deutlich größer und stärker granuliert.

In parallel durchgeführten Western Blot Untersuchungen zeigte sich auf Proteinebene (vgl. Abb. 80), dass sich die beiden Subpopulationen nicht nur in ihrer Her4-Expression unterscheiden, sondern sich zudem Unterschiede bzgl. der Expression des Östrogenrezeptors ergeben. Während die Her4<sup>high</sup>-Zellen nur in geringerem Umfang den ER exprimieren, ergeben die Her4<sup>low</sup>-Lysate stärkere Proteinbanden.



**Abb. 80**  
Östrogenrezeptorkonzentration in gesorteten ZR-75.1 Subpopulationen.

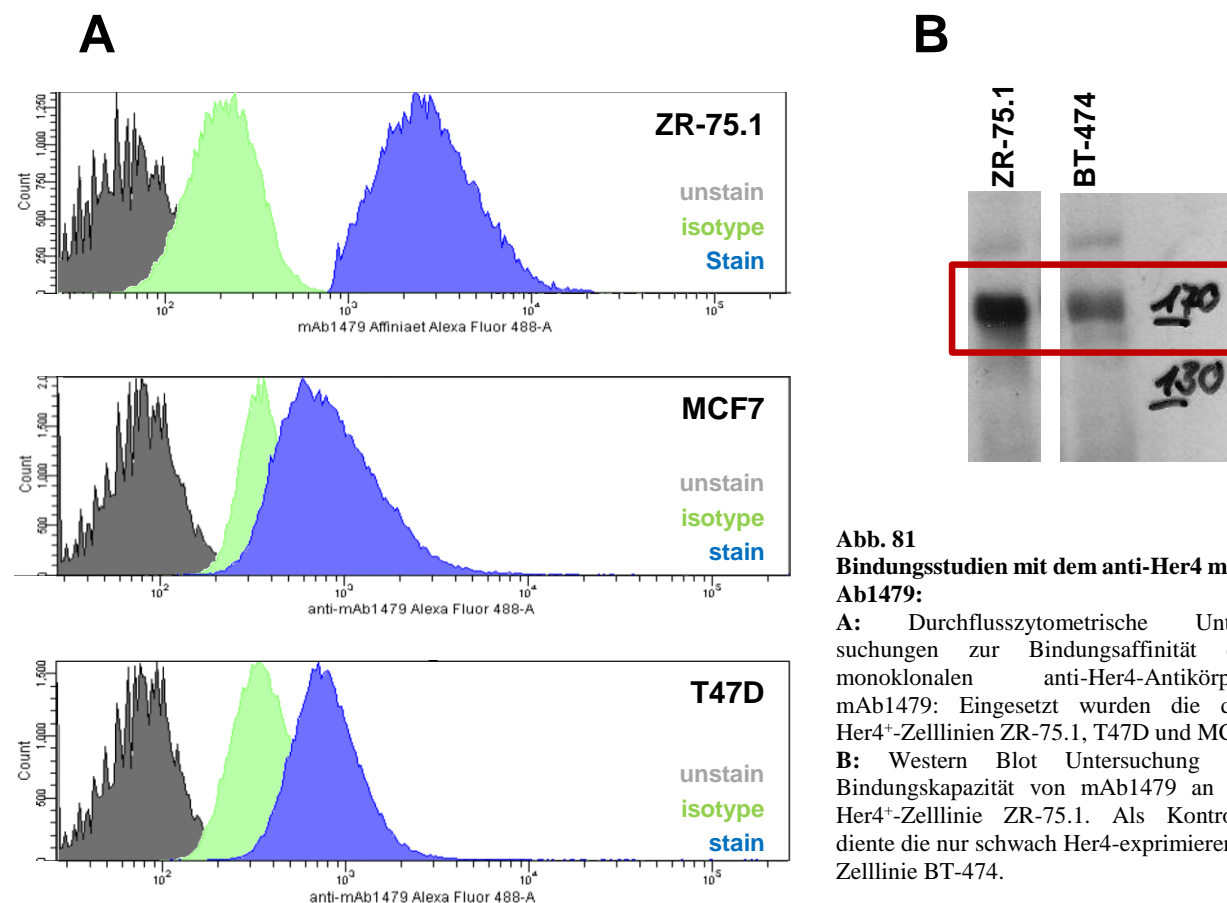
Dargestellt sind die normierten ER-Konzentrationen aus Western Blot Analysen von ZR-75.1<sup>high</sup>, ZR-75.1<sup>low</sup>, MCF7 und T47D Zellen bezogen auf eine ZR-75.1 Mischpopulation.

### 5.3.4 Bindungskapazität des therapeutischen Antikörpers mAb1479

Zur weitergehenden Charakterisierung des therapeutischen Potential des monoklonalen, anti-Her4-Antikörpers mAb1479 wurde nach der Quantifizierung der reinen Expression des korrespondierenden Antigens (= Her4) auf den untersuchten Tumorzellen, die direkte Bindungskapazität des Antikörpers hieran untersucht. Erst durch diese Interaktion zwischen dem Antikörper und seinem Antigen können die in den folgenden Kapiteln beschriebenen direkten und indirekten immunologisch vermittelten Prozesse initiiert werden.

Für die Charakterisierung der mAb1479 Bindungskapazität wurden Untersuchungen mittels FACS (extrazelluläre Expression) und Western Blot (Gesamt-Protein) vorgenommen (vgl. Abb. 81).

Zusammenfassend bestätigt der mAb1479 die Ergebnisse, die mit kommerziell erhältlichen anti-Her4-Antikörper (vgl. Abb. 76 und 77) durchgeführt wurden. Im Unterschied zum unter 5.3.3 erörterten Einschub zu den ZR-75.1 Subpopulationen bzgl. des Her4-Status findet sich in der Bindungsaffinität dieser Zellen ein rein homogenes Fluoreszenzprofil. Auch der Nachweis von Her4 auf Proteinebene mittels Western Blot und m1479 als Primärantikörper erzielte die gleichen Ergebnisse, wie die Studien mit kommerziell erhältlichem anti-Her4-Antikörpern: Starke Expression bei ZR-75.1 und schwache Expression bei BT-474.



**Abb. 81**

**Bindungsstudien mit dem anti-Her4 mAb1479:**

**A:** Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Bindungsaffinität des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479: Eingesetzt wurden die drei Her4<sup>+</sup>-Zelllinien ZR-75.1, T47D und MCF.

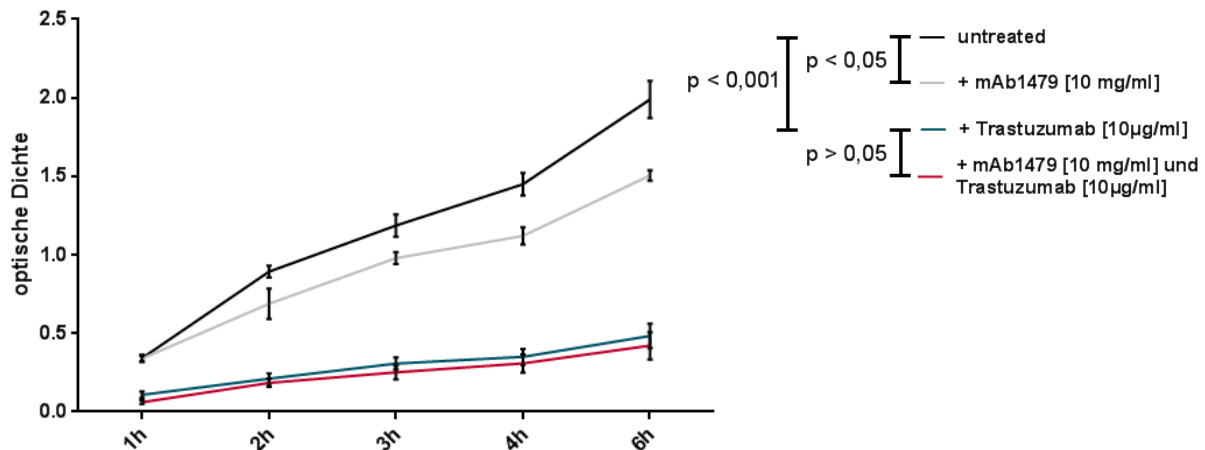
**B:** Western Blot Untersuchung zur Bindungskapazität von mAb1479 an die Her4<sup>+</sup>-Zelllinie ZR-75.1. Als Kontrolle diente die nur schwach Her4-exprimierende Zelllinie BT-474.

### 5.3.5 Direkte zelluläre Wirkmechanismen des anti-Her4-Antikörpers mAb1479

Nach der Charakterisierung und Etablierung des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479 sowie der in dieser Arbeit verwendeten Her4<sup>+</sup>-Zelllinien, soll nun das direkte Potential einer derartigen anti-Her4 Therapie eingeschätzt werden. Im Zentrum dieser Beurteilung stand die Fragestellung, in wie weit mAb1479 zu einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation, des Zellwachstums und des Zellmetabolismus führt.

#### 5.3.5.1 XTT-Assay zur Beurteilung der direkten Metabolismushemmung durch mAb1479

Die primär durchgeführten XTT-Assays ermöglichen Aussagen zur möglicherweise veränderten Zellvitalität und v. a. zum Zellmetabolismus. Hierbei betrug die Behandlungsdauer jeweils 7 Tage.



**Abb. 82 XTT-Assay mit ZR-75.1-Zellen (7d, 6000 Zellen/Well): Exemplarische Darstellung eines XTT-Assays zur Analyse des Her4-Rezeptors als therapeutisches Target einer Antikörpertherapie mit mAb1479.** Dargestellt sind die Daten eines dreifachen Ansatzes mit jeweils 6000 ZR-75.1 Zellen pro Well nach einer siebentägigen Behandlung. Die an der y-Achse aufgetragene optische Dichte entspricht der Differenz aus dem photometrischen Messwert und einem Mediumleerwert. Die Versuchsansätze wurden im dreifachen Ansatz durchgeführt, wobei die eingezeichneten Fehlerbalken dem Standardfehler (= SEM) dieser dreifachen Wiederholung entsprechen. Zwei weitere unabhängige Versuchsreihen ergaben ein übereinstimmendes Ergebnis des hier repräsentativ gezeigten XTT-Versuchs. Signifikante Unterschiede wurden in einer Two-way ANOVA Analyse nach Tukey multiple comparisons Test berechnet.

Sowohl die unbehandelten Kontrollzellen, als auch die unter mAb1479-Therapie zeigen eine stetige Umsetzung der XTT-Lösung, wobei diese durch den Antikörper signifikant inhibiert wird [Two-way ANOVA Bewertung ( $p = 0,04$ )].

Die Therapie mit Trastuzumab führt im direkten Vergleich jedoch zu einer deutlich stärkeren Hemmung des zellulären Metabolismus und der Proliferation ( $p < 0,001$ ). Aufgrund der bereits sehr starken Wirksamkeit von Herceptin zeigt die Kombination beider Antikörper keinen weiteren additiven inhibierenden Effekt auf den Zellstoffwechsel.

#### 5.3.5.2 SPF-Assay zur Beurteilung der direkten Zellproliferationshemmung durch mAb1479

In Abb. 83 werden die gemessenen S-Phase-Fractionen (SPF) der untersuchten Her4<sup>+</sup>-Zelllinien ZR-75.1, MCF7 und T47D dargestellt. Die Daten repräsentieren jeweils die Absolutwerte am Tag der Zellernte nach einer 48-stündigen Behandlung mit dem monoklonalen anti-Her4-Antikörper mAb1479.

Für alle untersuchten Zelllinien ergaben die durchgeführten Messungen für eine mAb1479-Behandlung keinerlei signifikante Beeinflussung der S-Phase-Fractionen. Die FACS-Messungen an T47D-Zellen zeigte sogar eine geringgradig pro-proliferierende Wirkung der mAb1479-Applikation [Anstieg der SPF von 14,93% ( $\pm 0,19$  %) auf 17,35% ( $\pm 1,9$  %)]. Allenfalls bei den ZR-75.1 Zellen waren Tendenzen einer Zellproliferationshemmung zu erkennen [Reduktion der SPF von 7,88 % ( $\pm 0,40$  %) auf 6,86 % ( $\pm 0,34$  %)].



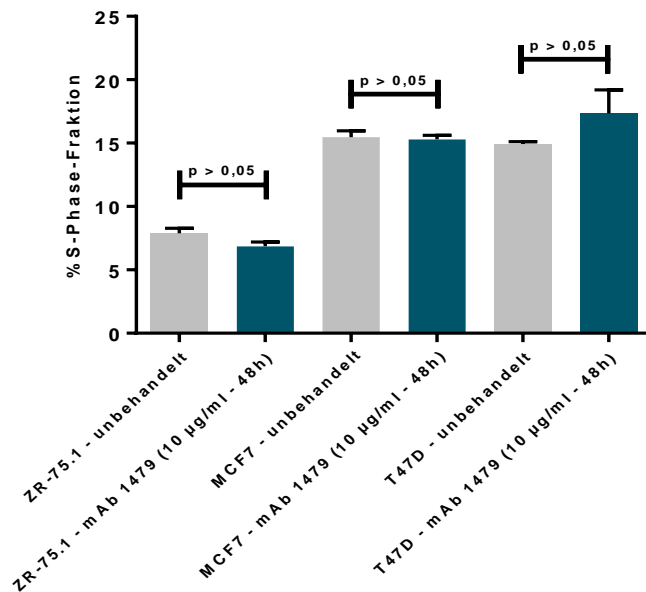


Abb. 83

**Durchflusszytometrische Ermittlung der S-Phase-Fraktion der Her4<sup>+</sup>-Zelllinien ZR-75.1, MCF7 und T47D in Abhängigkeit von einer 48-stündigen anti-Her4 Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper mAb1479 [10 µg/ml].**

Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zu den entsprechenden unbehandelten Kontrollen wurden im klassischen One-way ANOVA-Test nach Tukey's multiple comparisons berechnet und sind ebenso wie die Standardfehler (= SEM) des Mittelwertes von mindestens drei unabhängigen Versuchsreihen eingezeichnet.

### 5.3.5.3 BrdU-Höchst-Quenching-Assay zur Beurteilung eines direkten Zellzyklusarrests durch mAb147

Den dritten Abschnitt zur Evaluation einer anti-Her4-Antikörpertherapie mit mAb1479 bildeten durchflusszytometrische BrdU-Höchst-Quenching-Assays zur Ermittlung eines möglichen Zellzyklusarrests mit einer konsekutiven Erhöhung der G<sub>0</sub>-Fraktion der Zellen. Für diese Zellkulturexperimente wurden neben BT-474<sub>Wildtyp</sub> Zellen auch die mit dem ErbB4-Rezeptor transduzierten BT-474 JMaCyt2 Zellen eingesetzt (vgl. Abb. 84).

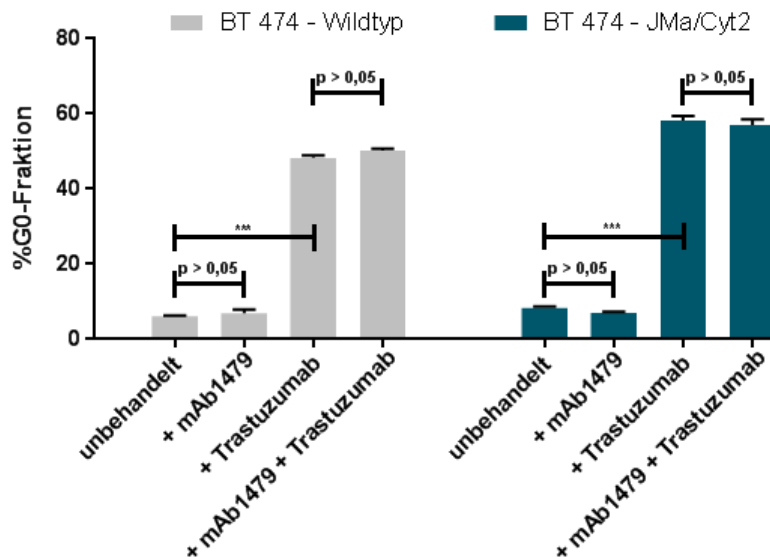


Abb. 84

**BrdU-Höchst-Quenching-Assay zur Beurteilung einer 96-stündigen mAb1479-Therapie auf die G<sub>0</sub>-Fraktion von Zellen der Zelllinie BT-474<sub>WT</sub> sowie auf ihre Her4-transfizierten Klone.** Die eingesetzte Antikörperkonzentration betrug jeweils 10 µg/ml. Die berechneten Mittelwerte repräsentieren drei unabhängigen Versuchsreihen und sind wie die korrespondierenden Standardfehler (= SEM) als Fehlerbalken eingezeichnet. Statistisch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) wurden im klassischen One-way ANOVA-Test nach Tukey's multiple comparisons berechnet. [\*\*\*  $p < 0,001$ ]

In der unbehandelten Kontrolle der Wildtyp BT-474 Zellen [vgl. Abb. 84, graue Balken] befinden sich 6,1 % ( $\pm 0,36$  %) der Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase. Diese ruhende Fraktion nimmt zwar absolut um 2,4 Prozentpunkte durch die Transduktion des Her4-Rezeptors [vgl. Abb. 84, dunkelblaue Balken] auf 8,5 % ( $\pm 0,75$  %) bei den veränderten Zellklonen zu, in der statistischen Bewertung ergibt sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Auch die Zugabe von mAb1479 bewirkt unabhängig von der Expression des Her4-Rezeptors keinen signifikanten Zellzyklusarrest. Entsprechend beträgt die G<sub>0</sub>-Fraktion bei BT-474<sub>WT</sub> 7,0 % ( $\pm 1,61$  %) bzw. 7,1 % ( $\pm 0,40$  %) bei BT-474<sub>JMaCyt2</sub>.

Aufgrund einer möglichen synergistischen Wirkung zwischen einer anti-Her4 und einer anti-Her2 gerichteten Antikörpertherapie wurden zudem beide Zellarten mit Trastuzumab sowie einer Kombination aus Trastuzumab und mAb1479 behandelt. Hierbei zeigt sich bei den Trastuzumab-behandelten Ansätzen eine jeweils

signifikante Steigerung der Zellen, die in der G0-Phase nachgewiesen werden können ( $p < 0,001$ ). Absolut nimmt dieser Anteil bei BT-474<sub>WT</sub> auf 48,3 % ( $\pm 1,02$  %) und bei BT-474<sub>JMaCyt2</sub> auf 58,2 % ( $\pm 2,04$  %) zu. Mit der Zugabe beider Antikörper kann jedoch keine weitere signifikante Steigerung erreicht werden [BT-474<sub>WT</sub>: 50,2 % ( $\pm 0,82$  %) und BT-474<sub>Cyt2</sub>: 57,0 % ( $\pm 2,68$  %)].

Zusammenfassend lässt sich eine Bindung des monoklonalen Antikörpers mAb1479 an sein Zielantigen Her4 nachweisen. Er induziert jedoch nur im XTT-Assay einen nachweisbaren direkten Effekt, wobei dieser in allen Untersuchungen signifikant geringer als ein Trastuzumab-vermittelter Einfluss ausfällt.

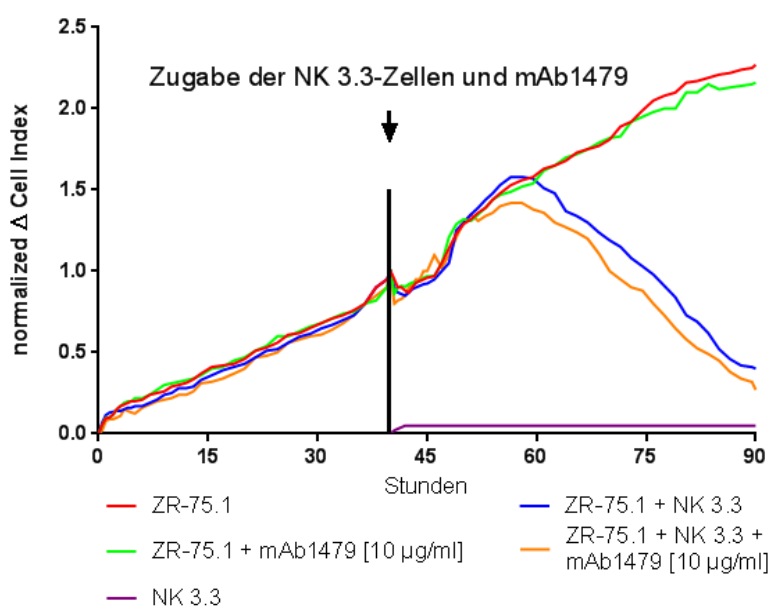
### 5.3.6 Indirekte, immunsystemvermittelte Wirkmechanismen des anti-Her4-Antikörpers mAb1479

#### 5.3.6.1 xCelligence-Untersuchungen

Die Ergebnisse von Cokulturansätzen mit der Effektorzelllinie NK 3.3 und den Her4-positiven Zielzelllinien ZR-75.1 (vgl. Abb. 85), MCF7 (vgl. Abb. 86) und T47D (vgl. Abb. 87) werden in den nachfolgenden Abbildungen zusammengefasst. Die Diagramme stellen jeweils den auf den Startpunkt der Cokultur normalisierten Cell Index in Abhängigkeit des Versuchszeitpunkts dar. Dieser Zeitpunkt der NK 3.3  $\pm$  mAb1479-Zugabe, ca. 40 Stunden nach Versuchsstart, ist jeweils anhand der Sprünge innerhalb der Wachstumskurven erkennbar und direkte Folge der Entnahme der E-Plates aus der Messapparatur bzw. dem Wärmeschrank. Ein schwarzer Balken markiert diesen Moment. Die Versuche wurden nach jeweils ca. 90 Stunden beendet.

#### Cokulturergebnisse mit ZR-75.1 und NK 3.3 in Anwesenheit von mAb1479

Die Messdaten der ZR-75.1 Monokulturen gibt die rote Kurve in Graphik 85 wieder. Diese steigt, auch nach Zugabe der Effektorzellen und der Antikörper zu den weiteren Versuchsansätzen, stetig an. Hierbei entspricht die Zunahme des normalisierten Cell Index mit der Zeit der Proliferation der Mammakarzinomzellen. Nach ca. 80 Stunden wird eine Plateauphase erreicht, was sich a. e. auf die gegenseitige Hemmung der Zellen, im Sinne einer Kontaktinhibition bei zunehmender Konfluenz in den Wells, zurückführen lässt. Eine Zugabe von mAb1479 [hellgrüne Kurve] verändert die gemessenen Impedanzwerte im Vergleich zur unbehandelten Probe nicht. Auch diese Zellen proliferieren bis nach ca. 80 Stunden ein Maximalwert erreicht wird.



**Abb. 85 xCelligence-Versuch mit Cokulturen aus ZR-75.1 Targetzellen in An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3 und des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479.** Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Wiederholungen, wobei die eingesetzte E:T-Ratio jeweils 1:1 betrug. Die einzelnen Versuchsansätze in den xCelligence-Diagrammen sind farbig codiert. Die roten Kurven geben die Ergebnisse der unbehandelten Monokulturen wieder. Eine mAb1479-Behandlung wird hellgrün dargestellt. Die Cokulturergebnisse sind blau und gelb gefärbt, wobei Erstere die reinen Wirkungen der NK 3.3 Zellen auf die Zielzellen beschreibt und der gelb-markierte Verlauf die NK-zellvermittelte ADCC-Effekte in Anwesenheit von mAb1479 repräsentiert.

Die normalisierten Cell Indices der ZR-75.1 Zellen in den Cokulturansätzen mit der Effektorzelllinie NK 3.3 [blaue Kurve] fallen ca. 18 Stunden nach Zugabe der natürlichen Killerzellen signifikant gegenüber den

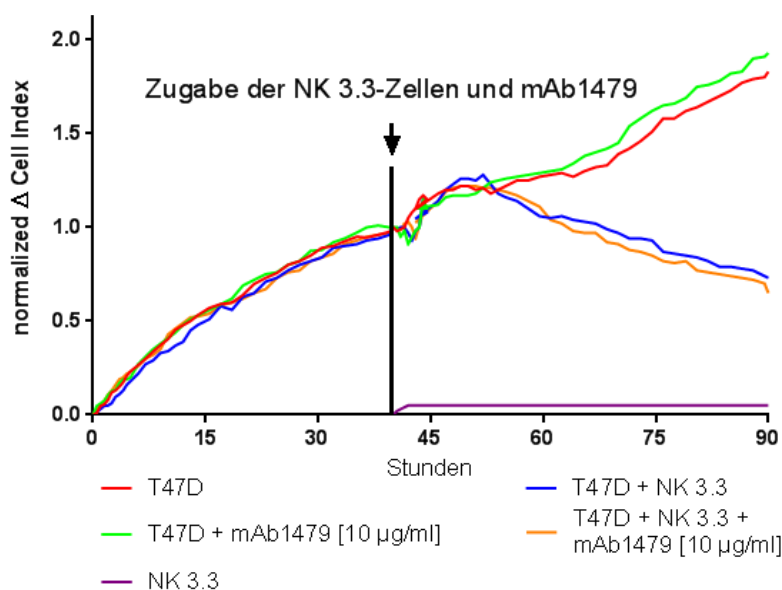


Monokulturen ab. Da die NK 3.3 Zellen als Suspensionszellen [lila Kurve] selbst keine Impedanzänderungen verursachen, sind die gemessenen Werte mit einem Adhäsions- bzw. Proliferationsverlust der ZR-75.1 Zellen vereinbar, der sich durch die Apoptoseinduktion in den Mammakarzinomzellen erklären lässt.

Die zusätzliche Anwesenheit des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479 reduziert den normalisierten Cell Index zwar geringgradig im Vergleich zu den unbehandelten Cokulturen. Da sich in der statistischen Bewertung jedoch kein signifikanter Unterschied ergibt, kann für mAb1479 in diesen Versuch kein NK-zellvermittelter ADCC-Effekt nachgewiesen werden.

### **Cokulturergebnisse mit T47D und NK 3.3 in Anwesenheit von mAb1479**

Als zweite Her4<sup>+</sup>-Zelllinie wurden T47D Zellen auf ihre Sensitivität gegenüber einer direkten sowie indirekten immunvermittelten Behandlung mit mAb1479 im xCelligence-System untersucht. Der Versuchsaufbau und dessen Durchführung orientierten sich dabei an den zuvor beschriebenen ZR-75.1 Zellen.



**Abb. 86 xCelligence-Versuch mit Cokulturen aus T47D Targetzellen in An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3 und des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479.**

Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Wiederholungen, wobei die eingesetzte E:T-Ratio jeweils 1:1 betrug. Die einzelnen Versuchsansätze in den xCelligence-Diagrammen sind farbig, wie in der nebenstehenden Legende beschrieben, codiert.

In Abbildung 86 wird die T47D-Monokultur erneut als rote Kurve, die mit mAb1479 behandelten T47D-Zellen in Hellgrün dargestellt. Beide Ansätze zeigen einen annähernd parallelen Verlauf ihrer normalisierten Cell Indices, wobei diese im zeitlichen Versuchsverlauf stetig zunehmen. In der 90-stündigen Messzeit wird jedoch kein Impedanzplateau erreicht. Somit ergeben sich auch für die T47D Zellen, nach diesen xCelligence Ergebnissen, keine direkten mAb1479-Wirkungen bzgl. einer Proliferations- oder Adhäsionshemmung.

Die Cokultivierung mit NK 3.3 Zellen [blaue Kurve] reduziert über die zytotoxischen Eigenschaften der natürlichen Killerzellen erneut deutlich die  $\Delta$ CI-Werte, während die zusätzliche Applikation des anti-Her4-Antikörpers mAb1479 [gelbe Kurve] im Sinne einer ADCC-Reaktion keinen weiteren Einfluss auf die Mammakarzinomzellen nimmt.

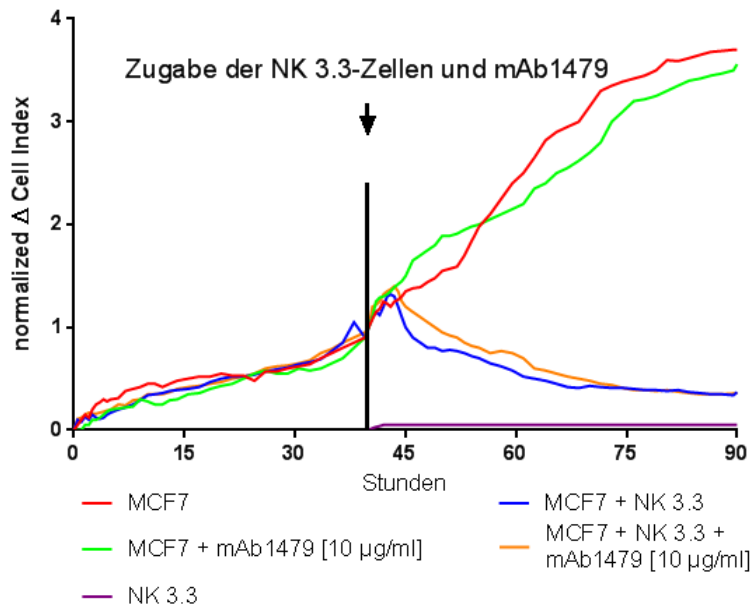
### **Cokulturergebnisse mit MCF7 und NK 3.3 in Anwesenheit von mAb1479**

Als dritte Her4<sup>+</sup>-Zelllinie wurde MCF7 bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber einer direkten bzw. immunvermittelten mAb1479 Behandlung im xCelligence-System untersucht. Die Versuchsaufbau sowie die farbliche Codierung der einzelnen Versuchsansätze entsprach der der beiden anderen Her4<sup>+</sup>-Zelllinien. Das Ergebnis einer repräsentativen Messung der normierten Cell Indices ist in Diagramm 87 abgebildet.

Aus Zellkulturbeobachtungen ist bekannt, dass sich MCF7-Zellen nach einer protrahierten Anwachsphase durch eine schnellere Proliferation im Vergleich zu ZR-75.1 und T47D auszeichnen. Dies führt im Rahmen der E-Plate-Kultivierung, nach Normierung auf den Zeitpunkt der Effektorzellzugabe, zu abschließend höheren  $\Delta$ CI-

Werten. Wie bei den beiden anderen Her4<sup>+</sup>-Zelllinien resultiert eine mAb1479 Zugabe [grüne Kurve] auch bei MCD7-Zellen in keiner Hemmung der Zellteilung.

Die Cokultivierung mit natürlichen Killerzellen [blaue Kurve] führt erneut zu einer deutlichen Abnahme der  $\Delta$ CI-Werte. Ein verstärkter zytotoxischer Effekt durch die parallele mAb1479 Inkubation ließ sich allerdings abermals nicht nachweisen [gelbe Kurve].



**Abb. 87 xCelligence-Versuch mit Cokulturen aus MCF7 Targetzellen in An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3 und des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479.**

Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängigen Wiederholungen, wobei die eingesetzte E:T-Ratio jeweils 1:1 betrug. Die einzelnen Versuchsansätze in den xCelligence-Diagrammen sind farbig, wie in der nebenstehenden Legende beschrieben, codiert.

### 5.3.6.2 Apoptose-Assays

Zur genaueren quantitativen und qualitativen Bewertung der obigen xCelligence-Untersuchungen wurden weiterführende Annexin-DAPI-Assays durchgeführt. Diese durchflusszytometrischen Messungen erlauben die spezifische Unterscheidung der vitalen von den früh- bzw. spätapoptotischen Zellen.

### Cokulturergebnisse mit ZR-75.1 und NK 3.3 in Anwesenheit von mAb1479

Die durchflusszytometrische Auswertung der durch den anti-Her4-Antikörper mAb1479 vermittelten Apoptoseinduktion in den Her4<sup>+</sup>-Zelllinien ZR-75.1, T47D und MCF7 erfolgte analog zu den Cokulturerperimenten mit den Her2<sup>+</sup>-Zelllinien in Kapitel 5.2.3. Die Effektorzellen wurden erneut in einem Verhältnis 1 : 1 zu den Targetzellen eingesetzt. Die Antikörperkonzentration betrug jeweils 10  $\mu$ g/ml. Die genauen Gatingstrategie und die theoretischen Grundlagen sind detailliert in Kapitel 4.2.3.3 dargestellt.

Abbildung 88 fasst die Versuchsergebnisse mit **ZR-75.1** als Targetzelle graphisch zusammen. Hierbei enthalten die ZR-75.1 Monokulturen [schwarze Kurve] gemittelt über den 72-stündigen Untersuchungszeitraum ca. 19,3 % (17,73 % bis 24,2%) apoptotische Zellen. Die Zugabe des anti-Her4-Antikörpers mAb1479 [magenta Kurve] führt zu keiner signifikanten Zunahme dieser Fraktion an toten Zellen. Gemittelt über die drei Messzeitpunkte wurde der Anteil der Zellen im natürlichen Zelltod mit 20,4 % ( $\pm$  2,6 %) durchflusszytometrisch vermessen.

In Cokultur mit natürlichen Killerzellen [schwarz gepunktete Kurve] steigt der Anteil der Zellen in Apoptose in Abhängigkeit der Cokulturdauer jedoch hochsignifikant an (Two-way ANOVA:  $p < 0,0001$ ). Hier beträgt der Anteil der noch lebenden Zellen nach 24 h 55,2 % ( $\pm$  1,3 %), nach 48 h lediglich 35,8 % ( $\pm$  2,5 %) und nach 3 Tagen nur noch 30,33 % ( $\pm$  2,0 %). Mit der zusätzlichen Applikation von mAb1479 [magenta gepunktete Kurve] und dem damit einhergehenden ADCC-Effekt des Antikörpers durch die natürlichen Killerzellen wird zeitpunktsabhängig eine weitere signifikante Steigerung der Tumorzellfraktion in Apoptose im Vergleich zu den korrelierenden unbehandelten Cokulturen erreicht. Die dynamische Bewertung nach Two-way ANOVA liefert gemittelt über die gesamten 72 Stunden ein signifikanten p-Wert von  $p = 0,014$ . Aufgeschlüsselt in die

drei Messzeitpunkte, bewirkt die 24-stündige gemeinsame Kultivierung zwar eine absolute Zunahme der toten Tumorzellen auf 48,6 % ( $\pm 1,0$  %), dies entspricht jedoch keinem signifikantem Unterschied ( $p > 0,05$ ). Nach 48 Stunden lässt sich hingegen nach One-way ANOVA und einem Apoptoseanteil von 70,5 % ( $\pm 2,2$  %) ein statistisch signifikanter ADCC-Effekt vermessen ( $p < 0,05$ ). Nach weiteren 24 Stunden gemeinsamer Kultivierung ergibt sich am dritten Tag keine weitere signifikante Steigerung ( $p > 0,05$ ) des natürlichen Zelltodes in ZR-75.1-Zellen durch die antikörpervermittelte Zytotoxizität im Vergleich zur reinen Kokultur. Hier beträgt der maximaler Apoptoseanteil 72,0 % ( $\pm 1,1$  %).

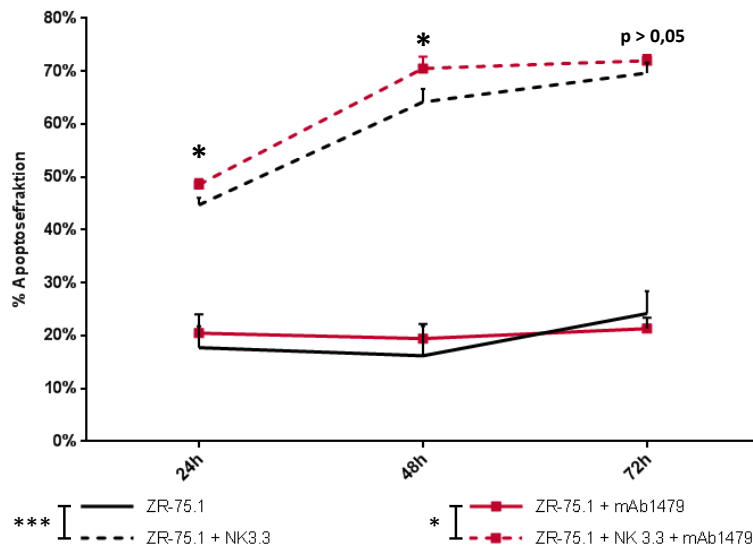


Abb. 88

**Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in Her4<sup>+</sup>-ZR-75.1 Zellen durch den monoklonalen anti-ErbB4 Antikörper mAb1479 bei An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3.** Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 24, 48 und 72 Stunden nach Start der Kokultur. Die einzelnen Versuchsansätze sind farbig, wie in der nebenstehenden Legende beschrieben, codiert.

[\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ]

### Cokulturergebnisse mit T47D und NK 3.3 in Anwesenheit von mAb1479

Auch T47D Zellen wurden in Mono- und gemeinsamer Kultur mit NK 3.3 sowie unter Antikörperbehandlung hinsichtlich ihres Anteils an apoptotischer Zellen nach 1, 2 und 3 Tagen am Durchflusszytometer analysiert.

In den Monokulturen [schwarze Kurve] ließen sich gemittelt über die vier Messpunkte etwa 11,1 % der Zellen Annexin V-FITC oder Annexin V-FITC / DAPI positiv anfärben. Somit lag der Apoptoseanteil im Vergleich zu den ZR-75.1 Zellen deutlich darunter (vgl. Abb. 88). Auch bei dieser Zelllinie führte eine Therapie mit mAb1479 [magenta Kurve] unabhängig von der Behandlungsdauer zu keiner signifikanten Apoptoseinduktion.

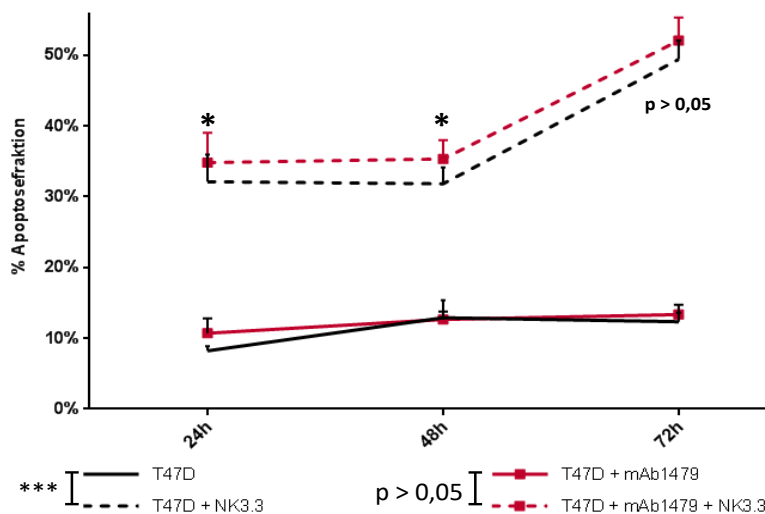


Abb. 89

**Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in Her4<sup>+</sup>-T47D Zellen durch den monoklonalen anti-ErbB4 Antikörper mAb1479 bei An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3.** Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 24, 48 und 72 Stunden nach Start der Kokultur. Die einzelnen Versuchsansätze sind farbig, wie in der nebenstehenden Legende beschrieben, codiert.

[\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ]

Lediglich die Kokultivierung mit natürlichen Killerzellen [schwarz gepunktete Kurve] führte erneut zu einem hochsignifikanten Anstieg ( $p < 0,005$ ) der apoptotischen Zellen, wobei deren Fraktionsgröße proportional zur Versuchsdauer zunahm. So vervierfachte sich der Anteil der apoptotischen ZR-75.1 Zellen nach 24 Stunden

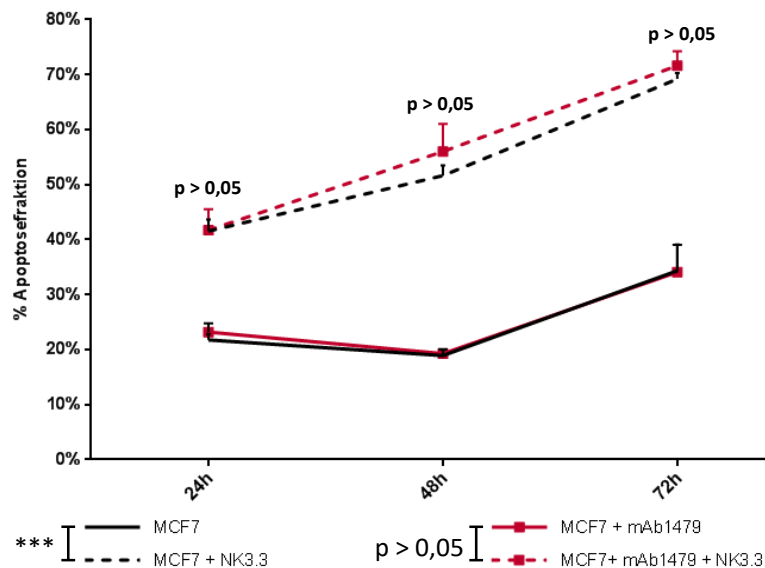
gemeinsamer Kultur mit NK 3.3 Zellen auf 32,1 % ( $\pm 3,8$  %). Nach drei Tagen Cokultur konnte sogar eine Apoptosefraktion von 49,4 % ( $\pm 2,6$  %) vermessen werden.

In Cokulturen mit mAb1479 [magenta gepunktete Kurve] lässt sich absolut über alle drei Messzeitpunkte eine weitere Erhöhung der avitalen Tumorzellen im Vergleich zur reinen Cokultur vermessen. In der statistischen Bewertung erscheint dieser mAb1479-vermittelte, immunologische Effekt in der One-way ANOVA Analyse nach einem bzw. zwei Tagen signifikant. Nach 72 Stunden wird dieser ADCC-Effekt jedoch durch die ausgeprägte, reine NK-zellvermittelte Apoptoseinduktion soweit überkompensiert, sodass sich im Vergleich keine Signifikanz mehr berechnen lässt.

### **Cokulturergebnisse mit MCF7 und NK 3.3 in Anwesenheit von mAb1479**

Mit den MCF7 wurde eine dritte Her4<sup>+</sup>-Zelllinie auf ihre Sensitivität gegenüber einer immunvermittelten mAb1479 Behandlung mittels Annexin-DAPI-Assays untersucht.

Die schwarze Kurve in Abb. 90 repräsentiert erneut die Monokulturen. Hier konnte ein Apoptoseanteil bei MCF7 Zellen in Abhängigkeit der Versuchsdauer von 21,8 % ( $\pm 1,1$  %), 18,9 % ( $\pm 1,1$  %) bzw. 34,3 % ( $\pm 5,0$  %) nach 24 h, 48 h bzw. 72 h berechnet werden. Erneut konnte die Zugabe von mAb1479 [magenta Kurve] diese Zellfraktion nicht signifikant erhöhen.



**Abb. 90**

**Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in Her4<sup>+</sup>-MCF7 Zellen durch den monoklonalen anti-ErbB4 Antikörper mAb1479 bei An- bzw. Abwesenheit der Effektorzelllinie NK 3.3.** Die eingezeichneten Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 24, 48 und 72 Stunden nach Start der Cokultur. Die einzelnen Versuchsansätze sind farbig, wie in der nebenstehenden Legende beschrieben, codiert.

[\*\*\* p < 0,001]

Durch die Cokultivierung mit NK 3.3 Zellen [schwarz gepunktete Kurve] lässt sich der Anteil der Zellen im natürlichen Zelltod auch bei der Zelllinie MCF7 zu jedem Messzeitpunkt signifikant erhöhen ( $p < 0,05$ ). Dieser Anteil korreliert zudem mit der Versuchsdauer. Auch gemittelt über die maximal 72-stündige Versuchsdauer ergibt sich in der Two-way ANOVA Analyse ein Signifikanzwert von  $p < 0,001$ .

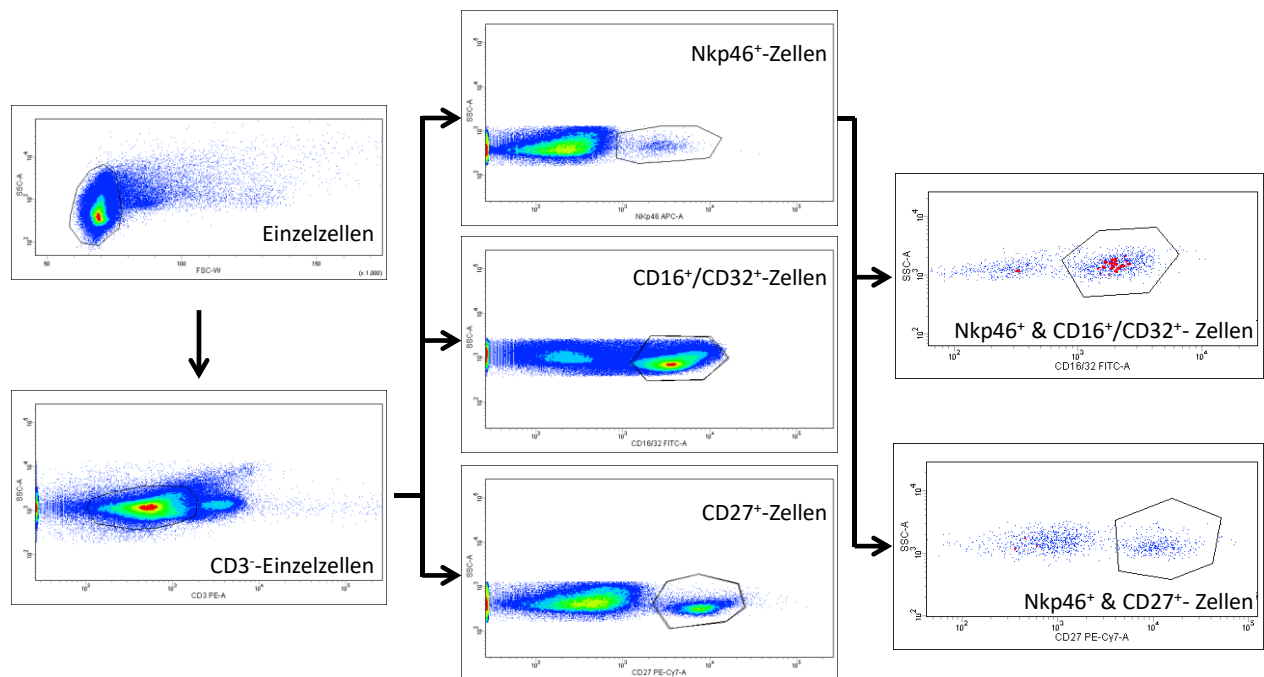
Die magenta gepunktete Kurve codiert die Versuchsansätze der mAb1479-behandelten Cokulturen. Obgleich der ADCC-Effekt zu absolut mehr avitalen Zellen im Vergleich zur unbehandelten Cokultur führt, zeigt sich dieser Unterschied weder zu einem einzelnen Messzeitpunkt, noch kumuliert über den gesamten Experimentverlauf als signifikant [ $p$  jeweils  $> 0,05$ ].

### 5.3.7 Murine Effektorzellen

Eine mögliche Ursache des geringen ADCC-Potentials des anti-Her4-Antikörpers mAb1479 in Verbindung mit der humanen natürlichen Killerzelllinie NK 3.3 findet sich im murine Fc-Teil des monoklonalen Antikörpers. Vor diesem Hintergrund wurden abschließende Cokulturversuche mit murinen Effektorzellen durchgeführt. Als murine Immunzellen wurden hierbei Milzzellen von Mäusen des Inzuchtstammes CL57/BL6 eingesetzt.

#### 5.3.7.1 Charakterisierung muriner mononukleärer Zellen

In multiparametrischen Färbungen wurde der Phänotyp der murinen Effektorzellen durchflusszytometrisch bestimmt.

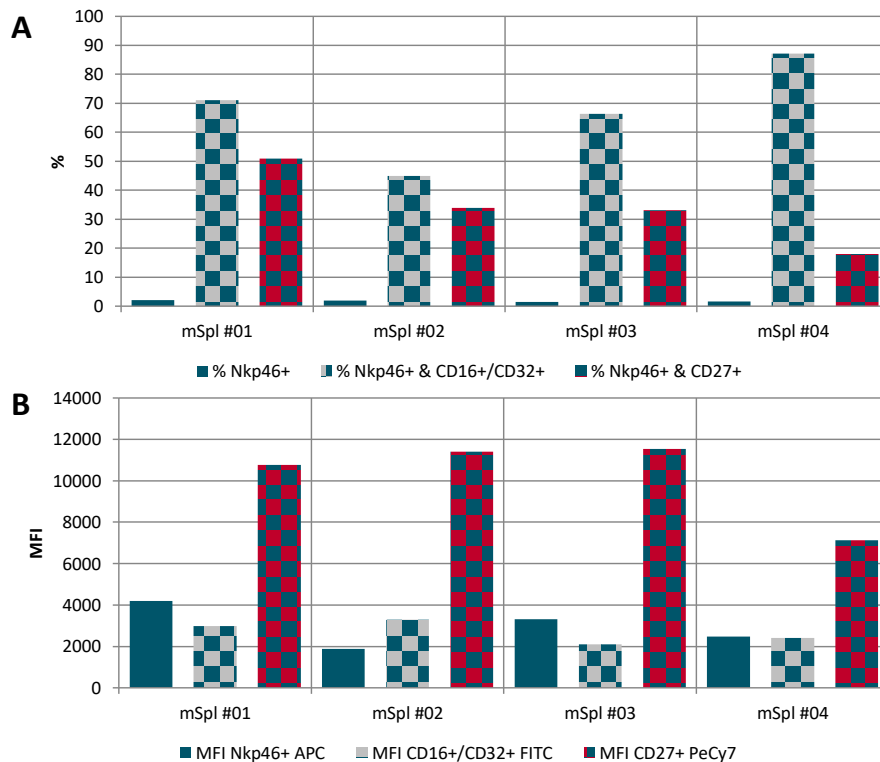


**Abb. 91 Gating-Strategie zur Phänotypisierung muriner Immunzellen.** Nach Selektion der Einzelzellen wurden zunächst die CD3<sup>+</sup>-Zellen ausgeschlossen. Diese Subpopulation konnte nun in untergeordneten Density-Blots in Nkp46<sup>+</sup>-, CD27<sup>+</sup>- sowie CD16/CD32<sup>+</sup>-Subfraktionen weiter differenziert werden. Zusätzlich wurden auch die Nkp46<sup>+</sup> NK-Zellen auf ihre Expression von CD27 bzw. der Fc $\gamma$ -Rezeptoren CD16 und CD32 untersucht. Neben dem relativen prozentualen Anteil der einzelnen Zellarten, floss ebenso die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Marker in die abschließende Bewertung ein.

Insgesamt wurden Immunzellen von vier Mausmilzen (mSpl) des Inzuchtstammes CL57/BL6 phänotypisiert und in die Cokulturexperimente von Kapitel 5.3.7.2 eingebracht. Die Auswertungsergebnisse für mSpl #1-4 sind in Diagramm 92 dargestellt.

Der Anteil der Nkp46<sup>+</sup>-Zellen beträgt gemittelt über die vier Tiere 1,8 % (min. 1,5 % bis max. 2,1 %), wobei diese natürlichen Killerzellen zudem überwiegend CD16<sup>+</sup>/CD32<sup>+</sup> waren. Lediglich mSpl #02 weist einen Anteil an zusätzlich CD16<sup>+</sup>/CD32<sup>+</sup>-Zellen von nur 44,9 % auf. Die simultane Expression von CD27 ist hingegen heterogen verteilt. Während mSpl #04 nur 18 % CD27<sup>+</sup>-Zellen enthält, weisen bei mSpl #01 ca. die Hälfte der Nkp46<sup>+</sup>-Zellen dieses Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie auf.

Die mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) dieser vermessenen Rezeptoren weisen ein heterogenes Verteilungsmuster auf. So ergeben sich für Nkp46 Werte von 1871 (mSpl #02) bis 4193 (mSpl #01). Ein korrelierender Vergleich der gemessenen MFIs zu den FACS-Ergebnissen an humanen natürlichen Killerzellen, wie in Kapitel 5.2.1 an NK 3.3 dargestellt, ist aufgrund der unterschiedlichen Primärantikörpern nicht möglich.



**Abb. 92 Phänotypisierung muriner Immunzellen aus der Milz (mSpl).**

**A)** Relativer Anteil der für den jeweiligen Marker positiven Zellen. Der prozentuale Wert bezieht sich hierbei auf die jeweilige übergeordnete Gating-Population. Entsprechend stehen die einfarbigen Balken in Verbindung zur CD3-Zellfraktion und die gepunkteten Anteile beziehen sich auf die Nkp46<sup>+</sup>-Zellen.

**B)** Vermessene Fluoreszenzintensitäten, wobei auch hier die gepunkteten Balken den zusätzlich Nkp46<sup>+</sup>-Zellen entsprechen.

### 5.3.7.2 Indirekte Apoptoseinduktion durch murine mononukleären Zellen

Der experimentelle Ablauf und die durchflusszytometrische Auswertung orientierte sich an den vergleichbaren NK 3.3 Cokulturversuchen (vgl. 5.3.6). Als Targetzellen kamen erneut die Her4<sup>+</sup>-Zelllinien ZR-75.1, T47D und MCF7 zum Einsatz. Als Effektorzellen wurden murine Splenozytensuspensionen (mSpl) aus Mäuse des Inzuchtstammes CL57/BL6 eingesetzt, wobei deren Gehalt an natürlichen Killerzellen in einer vorgeschalteten FACS-Analyse - wie im Abschnitte 5.3.7.1 erörtert - bestimmt wurde.

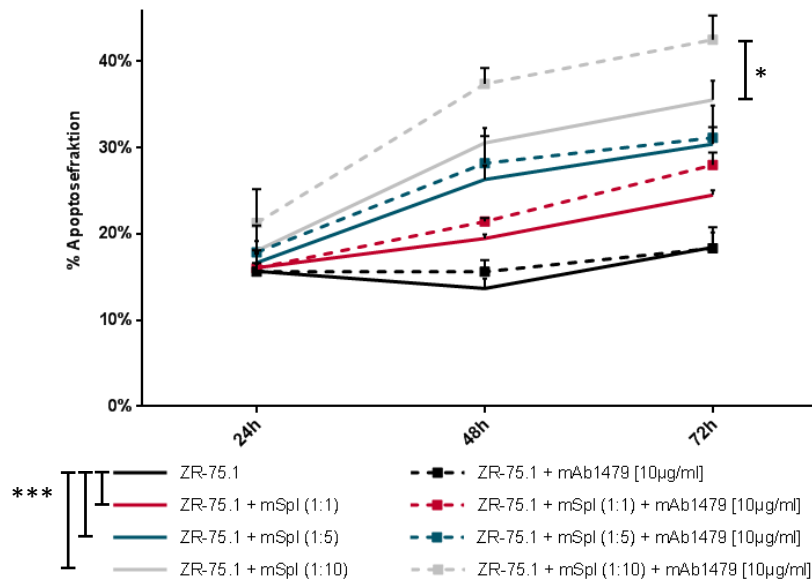
### Cokulturergebnisse mit ZR-75.1 und murinen Splenozyten in Anwesenheit von mAb1479

Die Versuchsergebnisse mit **ZR-75.1** als Targetzelle fasst Abbildung 93 graphisch zusammen.

Die beiden schwarzen Kurven dienten der internen Kontrollen und repräsentieren die ZR-75.1 Monokultur bzw. die mAb1479-behandelten ZR-75.1 Zellen [schwarz gepunktete Kurve]. Wie aus den zuvor dargestellten Untersuchungen (vgl. Kapitel 5.3.5 und 5.3.6) bekannt, zeigte dieser monoklonale Antikörper keine direkte Wirkung. Der Anteil der apoptotischen Zellen betrug gemittelt über den 72-stündigen Untersuchungszeitraum ca. 15,9 %.

Die Cokulturen mit murinen Splenozyten wurden mit drei verschiedenen E:T-Ratios durchgeführt. 24 Stunden nach Zugabe der Effektorzellen kommt es unabhängig von der eingesetzten Menge an Immunzellen zu keinem signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen. Dieser Anteil steigt nach 48 und 96 Stunden bei einem 1:5- [dunkelblaue Kurve] bzw. 1:10-Verhältnis [graue Kurve] signifikant an ( $p < 0,05$ ). Der statistische Vergleich der Cokulturkurven gegenüber der Monokultur ergibt über den insgesamt drei-tägigen Cokulturzeitraum nach Two-way ANOVA jeweils sogar eine hochsignifikante Apoptoseinduktion ( $p_{1:1} = 0,001$ ;  $p_{1:5} = 0,001$ ;  $p_{1:10} < 0,0001$ ).





**Abb. 93**  
Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in Her4<sup>+</sup>-ZR-75.1 Zellen durch den monoklonalen anti-ErbB4 Antikörper mAb1479 bei An- bzw. Abwesenheit von murinen Effektorzellen.

Eingezeichnet wurde - zeitlich aufgeschlüsselt - jeweils der statistische Mittelwert der prozentualen Apoptosefraktion mit der korrespondierenden Standardabweichung aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten.

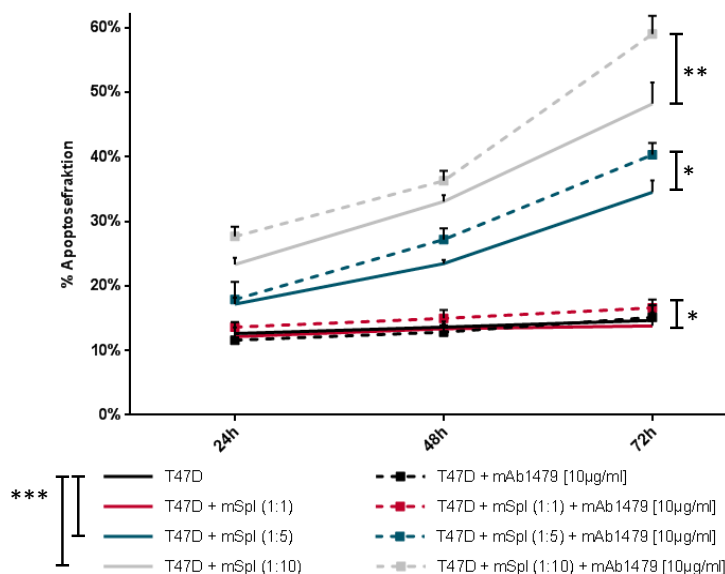
Die Messungen erfolgten 24, 48 und 72 Stunden nach Start der Kokultur. Die E:T-Ratio entsprach jeweils einem 1:1-, 1:5- bzw. 1:10-Verhältnis, wobei die Antikörper immer in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben wurden. [\* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001]

Einen signifikanten ADCC-Effekt mit einer weiteren Steigerung der Apoptose nach Zugabe des anti-Her4-Antikörpers mAb1479 [gepunktete Kurven; Codierung der E:T-Ratio entsprechend den Kokulturen] lässt sich für einen einzelnen Messzeitpunkt bei ZR-75.1 Zellen nicht nachweisen. In der dynamische Varianzanalyse nach Two-way ANOVA errechnet sich jedoch für den 1:10-Kokulturansatz über den insgesamt 72-stündigen Untersuchungszeitraum ein signifikanter ADCC-Effekt bei einem Signifikanzwert von  $p = 0,02$ .

#### Cokulturergebnisse mit T47D und murinen Splenozyten in Anwesenheit von mAb1479

Als zweite Her4<sup>+</sup>-Zelllinie wurden T47D Zellen experimentell auf ihre Sensibilität gegenüber einer Antikörperbehandlung mit mAb1479 untersucht (vgl. Abbildung 94).

Vergleichbar zu den T47D Versuchen in den Kapiteln 5.3.5 und 5.3.6 bewirkte die Zugabe von mAb1479 [schwarz gepunktete Kurve] zu den Monokulturen erneut keine Steigerung des Anteils der Annexin V-FITC<sup>+</sup>- und Annexin V-FITC<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>-Zellen. Eine Kokultivierung mit murinen Immunzellen führte hingegen ab einer Ratio von 1:5 und nach mindestens 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellpopulation ( $p < 0,05$ ). Nach Two-way ANOVA berechnen sich hierbei folgende Varianzen bzgl. der Apoptoseinduktion:  $p_{1:1} > 0,05$ ;  $p_{1:5} = 0,001$ ;  $p_{1:10} < 0,0001$ ).



**Abb. 94**  
Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in Her4<sup>+</sup>-T47D Zellen durch den monoklonalen anti-ErbB4 Antikörper mAb1479 bei An- bzw. Abwesenheit von murinen Effektorzellen.

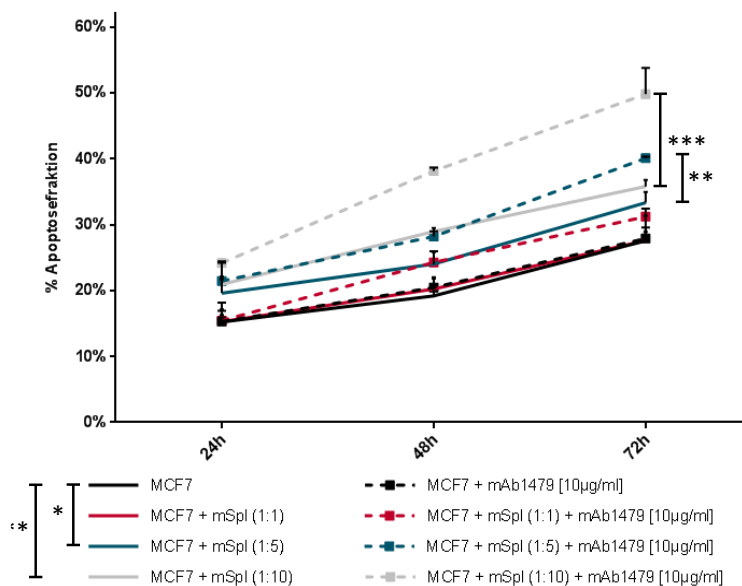
Eingezeichnet wurde - zeitlich aufgeschlüsselt - jeweils der statistische Mittelwert der prozentualen Apoptosefraktion mit der korrespondierenden Standardabweichung aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 24, 48 und 72 Stunden nach Start der Kokultur. Die E:T-Ratio entsprach jeweils einem 1:1-, 1:5- bzw. 1:10-Verhältnis, wobei die Antikörper immer in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben wurden.

[\* p < 0,05; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001]

Die Zugabe von mAb1479 induzierte in den Cokulturen [gepunktete Kurven; Codierung der E:T-Ratio entsprechend den Cokulturen] insbesondere nach mindestens 48 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Cokultur Apoptose. Gemittelt über alle drei Messzeitpunkte und statistisch bewertet nach Two-way ANOVA ergibt sich für alle drei untersuchten Effektor-Target-Verhältnisse ein mindestens signifikanter Unterschied. Während der Signifikanzwert beim 1:1 Verhältnis mit 0,03 nur knapp unterhalb der definierten Wahrscheinlichkeitsgrenze liegt, ergibt sich für die größeren E:T-Ratios bei 1:5 ein p-Wert von 0,016 und bei 1:10 sogar ein hochsignifikanter p-Wert von  $p=0,0046$ .

### Cokulturergebnisse mit MCF7 und murinen Splenozyten in Anwesenheit von mAb1479

Die dritte und letzte Her4<sup>+</sup>-Zelllinie, deren Sensitivität gegenüber einer ADCC-vermittelten mAb1479-Therapie durchflusszytometrisch mit murinen Effektorzellen untersucht wurde, war MCF7. In Graphik 95 werden die Ergebnisse dargestellt.



**Abb. 95**

**Annexin-DAPI-Apoptose-Assay zur kinetischen Beurteilung der Apoptoseinduktion in Her4<sup>+</sup>-MCF7 Zellen durch den monoklonalen anti-ErbB4 Antikörper mAb1479 bei An- bzw. Abwesenheit von murinen Effektorzellen.**

Eingezeichnet wurde - zeitlich aufgeschlüsselt - jeweils der statistische Mittelwert der prozentualen Apoptosefraktion mit der korrespondierenden Standardabweichung aus insgesamt drei unabhängigen Experimenten. Die Messungen erfolgten 24, 48 und 72 Stunden nach Start der Cokultur. Die E:T-Ratio entsprach jeweils einem 1:1-, 1:5- bzw. 1:10-Verhältnis, wobei die Antikörper immer in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben wurden.

[\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ]

Im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Her4<sup>+</sup>-Zelllinien nimmt bei MCF7 mit der Kulturzeit der Apoptoseanteil stetig zu. Diese Messergebnisse decken sich mit den vergleichbaren Versuchen aus Kapitel 5.3.6. Ein Unterschied im Vergleich zur MCF7-Monokultur nach mAb1479 Applikation ergibt sich erneut nicht.

Bedingt durch die murinen Milzzellen zeigten die Cokulturen ab einem Verhältnis von 1 zu 5 einen signifikanten Unterschied in der Apoptoseinduktion im Vergleich zu den Monokulturen [Two-way ANOVA Analyse:  $p_{1:5} = 0,0124$  bzw.  $p_{1:10} = 0,0026$ ]. Die zusätzlich mit 10 µg/ml mAb1479 behandelte Cokulturen [gepunktete Kurven; Codierung der E:T-Ratio entsprechend den Cokulturen] weisen bei einer E:T-Ratio von 1:5 bzw. 1:10 einen hochsignifikanten ADCC-Effekt auf [Two-way ANOVA Analyse:  $p_{1:5} = 0,0013$  bzw.  $p_{1:10} = 0,0003$ ].

Zusammenfassend zeigt sich damit ein signifikanter ADCC-Effekt des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479 mit murinen Effektorzellen bei allen drei untersuchten Targetzelllinien. Zum Teil war hierzu jedoch ein erhöhtes E-T-Verhältnis bzw. eine gemeinsame Cokultivierungsdauer von mindestens 48 Stunden notwendig. Unter Einsatz von humanen natürlichen Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 (vgl. Kapitel 5.3.6) konnte hingegen lediglich bei ZR-75.1 und T47D Zellen jeweils lediglich grenzwertige ADCC-Effekte durch mAb1479 erzielt werden.



## 6 DISKUSSION

Die Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren umfasst vier eng verwandte Vertreter: den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR, auch ErbB1 oder Her 1 genannt, den ErbB2 (Her2), den ErbB3 (Her3) und den ErbB4 (Her4).

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand der ErbB2- und der ErbB4-Rezeptor. Ersterer ist bei geringem Expressionsausmaß an der normalen Embryonalentwicklung von verschiedenen humanen Organen, wie der Brust, der Ovarien, der Lunge, der Leber, der Niere und des ZNS beteiligt<sup>7,11,33</sup>. Andererseits ist eine Her2-Überexpression mit verschiedenen Tumorarten<sup>10,11,23,39</sup>, insbesondere dem Mammakarzinom<sup>37</sup>, assoziiert. Ursächlich hierbei ist überwiegend eine Genamplifikation. Entsprechend zeichnen sich auch 15 % - 25 % der invasiven Mammakarzinome durch eine Her2-Überexpression aus<sup>34,35,41</sup>. Des Weiteren ist dieser Tumorsubtyp mit einem schlechteren Patientenoutcome und einer aggressiveren Tumorbilologie assoziiert<sup>42</sup>.

Aus diesem Grund bietet der ErbB2-Rezeptor mit seinen extra- bzw. intrazellulären Domänen Angriffsziele für verschiedene Target-spezifische Therapeutika des Mammakarzinoms. Mit dem Einsatz von Trastuzumab, Pertuzumab oder Lapatinib konnte in verschiedenen klinischen Studien im Vergleich zur klassischen Chemotherapie ein signifikant besseres Outcome für die Patientinnen erreicht werden<sup>44,123,150</sup>.

Der Her4-Rezeptor als letztentdeckter Vertreter ErbB-Rezeptorenfamilie verfügt trotz sehr ähnlichem strukturellem Aufbau<sup>45</sup> über einige funktionelle Besonderheiten, wie der direkten Signaltransduktion in den Zellkern über seine intrazelluläre Domäne (4ICD) und dem Vorliegen von vier verschiedenen Splicevarianten (vgl. auch 1.2.4.3). Sein Stellenwert in der Onkogenese sowie für den Tumorprogress - insbesondere beim Mammakarzinom - ist weiterhin kontroverser Gegenstand aktueller Forschungsbemühungen. So finden sich sowohl Literaturstellen, die das Auftreten des Her4-Rezeptors mit einem besseren Patientenoutcome als auch mit einer verringerten Prognose in Verbindung bringen. Anders als für den ErbB2-Rezeptor haben zielspezifische Therapeutika, gerichtet gegen den Her4-Rezeptor, noch keinen Einzug in die Klinik erhalten. Mit der Entwicklung des monoklonalen anti-Her4-Antikörpers mAb1479, dessen mögliches therapeutisches Potential auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, stehen jedoch bereits für die Grundlagenforschung mögliche Substanzen zur Verfügung.

### 6.1 POTENTIAL UND LIMITATION EINER ANTI-HER2 GERICHTETEN ANTIKÖRPERTHERAPIE

Die wichtigste Zelllinie der vorliegenden Promotionsarbeit bildeten BT-474 Zellen, die als sensibel gegenüber einer Behandlung mit den monoklonalen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab vorbeschrieben sind<sup>131,163</sup>. Auf subzellulärer Ebene ist diese Eigenschaft auf eine Genamplifikation des zugrundeliegenden Genabschnitts zurückzuführen, die mit einer starken Her2-Überexpression einhergeht<sup>162</sup>. Dies prädestiniert diese Zellart für eine zielgerichtete Therapie gegen ihren ErbB2-Rezeptor.

Auch die in Kapitel 5.1 dargestellten Untersuchungen unterstrichen ihre hohe Ansprechrate gegenüber diesen therapeutischen Antikörpern. Besonders ausgeprägt zeigt sich die Trastuzumab-vermittelte Reduktion der Zellproliferation ( $p < 0,005$ ). Entsprechend lässt sich lediglich  $\frac{1}{4}$  der ursprünglichen Zellpopulation in der S-Phase nach einer 2- bzw. 3-tägigen Kultivierung unter Herceptin vermessen. Auch der Zellmetabolismus nimmt in Folge einer Trastuzumab-Applikation signifikant ab.

Natürlicher Zelltod wird hingegen lediglich in einem ungeordnetem Ausmaß durch Trastuzumab ( $p = 0,05$ ), nicht jedoch durch Pertuzumab, induziert. Auch die durchgeführten xCelligence-Untersuchungen mit BT-474 Monokulturen bestätigen diese Versuchsergebnisse (vgl. Abb. 53a). Mit der Zugabe des therapeutischen Antikörpers proliferieren die Zellen zwar deutlich langsamer, was sich in einem flacheren Anstieg des  $\Delta CI$ -

Wertes ausdrückt, es kommt jedoch nicht - wie bei Cokulturen - zu einer Abnahme und somit zur Apoptose-induktion.

Auch in der Zusammenschau mit der Fachliteratur ergeben sich zahlreiche Belege, dass BT-474 auf eine direkte Behandlung mit Trastuzumab zwar mit einer signifikanten Einschränkung der Zellproliferation sowie des Metabolismus reagiert, jedoch kaum Apoptose induziert wird<sup>114,163,200–202</sup>. Zur untergeordneten Rolle der Apoptoseinduktion sei an dieser Stelle auch auf die klinische Studie von Mohsin et al. aus dem Jahr 2005 verwiesen. Obgleich bei den Studienpatientinnen, die an einem lokal-fortgeschrittenen Her2<sup>+</sup>-Mammakarzinom erkrankten, durch eine Herceptin-Monotherapie eine Woche nach Behandlungsbeginn ein signifikanter Anstieg der Apoptose gezeigt werden konnte, war dieser Effekt zum einen im längerfristigen Verlauf der Studie nicht mehr nachweisbar. Zum anderen repräsentieren diese Ergebnisse selbstverständlich ein Mischbild der direkten Trastuzumabwirkung mit indirekten immunsystemvermittelten Mechanismen<sup>203</sup>.

Ergänzt wurden die Untersuchungen i. R. dieser Arbeit um Experimente mit BT-474 Zellen, die über mehrere Wochen kontinuierlich Trastuzumab ausgesetzt waren. Über diesen Selektionierungsprozess konnten stabil trastuzumabresistente BT-474 Klone (vgl. Kapitel 3.1 und 5.1.4) in der Arbeitsgruppe Brockhoff etabliert werden. Im Widerspruch zu zahlreichen veröffentlichten Beobachtungen, dass Mammakarzinomzellen als Resistenzmechanismus mit einer Downregulation ihres Wachstumsrezeptors auf eine anti-ErbB2 gerichtete Therapie reagieren<sup>129,200,204</sup>, konnte dies – wie in Abbildung 47 gezeigt – nicht vermessen werden. Ursächlich scheinen vielmehr andere Hemmungsmechanismen. Funktionell reagierten die resistenten BT-474 Zellen weder bzgl. der Proliferation, des Metabolismus oder der Vitalität auf eine Therapie mit Trastuzumab, wiesen jedoch weiterhin eine Sensitivität gegenüber Pertuzumab auf. Dieser weitere anti-Her2-Antikörper besitzt eine im Vergleich zu Trastuzumab verschiedene Bindungsstelle an der extrazellulären Rezeptordomäne des ErbB2-Rezeptors<sup>138</sup>. Die unterschiedliche Epitopbindung dieser beiden Antikörper, die einen additiven Besatz mit beiden Antikörpern ermöglicht, konnte mit Hilfe von fluoreszenzgekoppeltem Trastuzumab bzw. Pertuzumab auch in dieser Arbeit durchflusszytometrisch bestätigt werden (vgl. 5.1.5).

Als abschließende Her2<sup>+</sup>-Vergleichszelllinie wurden JIMT-1 Zellen verwendet. Diese als intrinsisch Trastuzumab-resistent vorbeschriebene Zellen entstammen einem Isolat einer pleuralen Mammakarzinom-metastase einer 62-jährigen Frau, die unter laufender Trastuzumabtherapie einen Tumorprogress erlitt. Obgleich sie mit einer Her2-Überexpression (ICH 3<sup>+</sup>) bei zugrunde liegender c-ErbB2 Genamplifikation vorbeschrieben sind, schätzten Nagy et al. das Her2-Expressionniveau dieser Zellart niedriger als das von BT-474 ein<sup>129,199</sup>. Auch der für JIMT-1 vermessene MFI-Wert von 17288 ( $\pm$  629 SEM) in den anti-Her2 FACS-Untersuchungen lässt sich auf nur ungefähr ein Fünftel der Her2-Expression im Vergleich zu BT-474 Zellen schließen. Unabhängig von der gewählten Untersuchungsmethode zeichneten sich die JIMT-1 Zellen durch eine vollständige Resistenz gegenüber der Therapie mit Trastuzumab sowie Pertuzumab aus. Dies deckt sich mit Beobachtungen der Fachliteratur<sup>205</sup>.

## **6.2 PRÄDIKTIVE BEDEUTUNG EINER HER4-COEXPRESSION BEZÜGLICH EINES ANTI-ERBB2- BZW. ANTI-ER-TARGETINGS**

Vor dem Hintergrund der häufigen de novo oder erworbenen Resistenz von Brustkrebszellen gegenüber einer Antikörpertherapie, wurden für den klinischen Einsatz neben den seit Langem etablierten antihormonellen Behandlungsstrategien weitere Therapiealternativen entwickelt.

Bzgl. dieser weiteren medikamentösen Optionen stand insbesondere der niedermolekulare Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib (Tyverb®) im Fokus dieser Arbeit. Im Gegensatz zu den therapeutischen Antikörpern greift Lapatinib nicht an der extrazellulären Domäne der ErbB-Rezeptoren an, sondern blockiert direkt das intrazelluläre Signaling. Über die Bindung an EGFR und Her2 kann dieser duale Inhibitor darüber hinaus Apoptose induzieren<sup>148</sup>.

Daneben scheint auch das Ausmaß einer vorliegenden ErbB2-Überexpression sowie eine ursächliche Genamplifikation Einfluss auf die Ansprechrate von Mammakarzinomzellen gegenüber Lapatinib zu nehmen. Diese beobachtete Assoziation konnten Konecny et al. um den additiven Effekt einer Kombinationsbehandlung mit Trastuzumab ergänzen. Hier ließ sich eine gesteigerte proliferationshemmende Wirkung nachweisen<sup>146</sup>. Auch in der Klinik führte die Kombination von Trastuzumab und Lapatinib unter Studienbedingungen zu einem längeren metastasenfreien Überleben<sup>115</sup>. Leitliniengemäß wird Lapatinib allerdings zumeist als Zweitlinientherapeutikum nach Progress unter Trastuzumab eingesetzt<sup>123</sup>. Des Weiteren ist Lapatinib bei postmenopausalen Patientinnen unter bestimmten Bedingungen im metastasierten Stadium zugelassen<sup>123,147</sup>.

Auch die in Kapitel 5.3.2.2 erörterten Untersuchungen unterstreichen das große therapeutische Potential von Lapatinib. Im Vergleich zu einer Trastuzumab- oder Pertuzumab-Behandlung ergeben sich sogar deutlich größere Effekte. So zeigt sich sowohl im S-Phase-Assay wie auch in den BrdU-Quenching-Versuchen bzgl. der Proliferationshemmung eine hochsignifikante Reduktion der Zellteilung bei der Therapie von BT-474 Zellen. Beispielsweise nimmt der Anteil der ruhenden Zellpopulation in der G<sub>0</sub>-Phase um 920 % auf 78,5 % ( $\pm 4,5$  %) zu. Ebenso führt die Applikation dieses dualen Tyrosinkinaseinhibitors nach 48 bzw. 96 Stunden zu einer (hoch-)signifikanten Induktion von Apoptose.

Antihormonelle Therapien zählen zu den am längsten in der Klinik eingesetzten zielspezifischen Behandlungen. In der vorliegenden Arbeit kam der Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen zum Einsatz, der vergleichbar mit Lapatinib erneut deutlich signifikanter im Vergleich zu den therapeutischen Antikörpern die Proliferation und den Metabolismus, wie auch die Zellvitalität beeinflusst. Die erhobenen Ergebnisse werden detailliert in Kapitel 5.3.2.1 erörtert.

### **Prädiktive Therapieaussichten unter Berücksichtigung des ErbB-Rezeptoren Profils**

Die ErbB-Rezeptoren stehen in einem komplexen Netzwerk untereinander und mit weiteren Rezeptoren, wie beispielsweise dem Estrogenrezeptor, in Verbindung. Nicht zuletzt deshalb nimmt die Coexpression weiterer Rezeptoren Einfluss auf den Erfolg einer Target-spezifischen Therapie, die gegen den Her2- bzw. Estrogenrezeptor gerichtet ist<sup>132</sup>. Wie bereits im Einleitungskapitel zu Trastuzumab erörtert, beeinflusst die parallele Expression des EGFR die Ansprechrate von Mammakarzinomzellen derart, dass eine Downregulation dieses zweiten Rezeptors zu einer erhöhten Sensitivität führt<sup>131</sup>. Dieser Zusammenhang konnte 2015 erneut in einer retrospektiven Studie von Lee et al. bestätigt werden. Auch diese Forschergruppe arbeitete eine EGFR-Überexpression als negativen, unabhängigen prognostischen Faktor sowie seinen prädiktiven Stellenwert für das Ansprechen auf eine Herceptintherapie beim nicht metastasierten Her2-positivem Mammakarzinom heraus<sup>206</sup>.

In dieser Arbeit wurde nun als wichtiger Teilaspekt die Fragestellung untersucht werden, inwieweit die Coexpression des ErbB4-Rezeptors als viertes Mitglied seiner Rezeptorenfamilie Auswirkungen auf ein ErbB2- bzw. ER-Targeting besitzt. Zellbiologische fußt die These einer Einflussnahme, neben der Einbindung von Her4 in das komplexe ErbB-Netzwerk, im Speziellen auf seinen ambivalenten Wirkmechanismen. Nach der Etablierung eines epigenetischen Reaktivierungsmodells, wurde in Kapitel 5.3 mit BT-474 Zellen gearbeitet, in die semistabil der ErbB4-Rezeptor in der Splicevariante JMaCyt2 transduziert wurde. Diese selektive zusätzliche Expression ermöglichte daraufhin unter verschiedenen Behandlungsregimen den Stellenwert von Her4 näher zu charakterisieren.

### **Einfluss einer semistabilen ErbB4-Transduktion in BT-474 Brustkrebszellen**

Während in der Literatur die zusätzliche Expression des ErbB4-Rezeptors kontrovers und heterogen diskutiert wird, zeigten sich in den Untersuchungen zur semistabilen Transduktion des Rezeptors keine signifikanten Unterschiede in der Gegenüberstellung der unbehandelten Kontrollzellen. Sowohl die Versuche zum Proliferations- bzw. Metabolismusverhalten als auch die Annexin-Apoptose-Assays erbrachten vergleichbare Ergebnisse für beide Kohorten. In verschiedenen Veröffentlichungen finden sich hingegen Belege, dass Zellkulturen auf eine artifizielle ErbB4-Expression sowohl mit einer gesteigerten Proliferationskinetik<sup>50</sup> als auch mit erhöhten Apoptoseraten<sup>50,76,170</sup> reagieren können. Entsprechend konnten Sartor et al. in Folge einer

Her4-Aktivierung einen vermehrten Zellzyklusarrest, wie auch die gesteigerte Induktion von Apoptose nachweisen<sup>207</sup>.

Auch die translationale Übertragung auf die Klinik erbringt bzgl. einer Her4-Expression heterogene Ergebnisse. Während u. a. in den Arbeitsgruppen Brockhoff et al.<sup>66</sup> und Jones et al.<sup>58</sup> eine Assoziation zwischen einer ErbB4-Expression und dem verlängertem Überleben von Brustkrebspatientinnen belegt und somit seine tumorsuppressive Wirkung unterstrichen werden konnte, wurde auch gegensätzliche Studien veröffentlicht, die eher eine verringerte Prognose mit Her4 in Verbindung bringen. So zeigten Lodge et al. 2003 eine statistisch signifikante Korrelation ( $p = 0,002$ ) zwischen dem Nachweis von c-erbB4 und einem schlechteren klinischen Outcome der Patienten<sup>69</sup>. Andere Autoren wiederum konnten, trotz unterschiedlicher Her4-Expression, keinen Einfluss auf das Patientenüberleben ermitteln<sup>70,73,75</sup>.

Einige weitere Beispiele zur Einordnung des ErbB4-Rezeptors als prognostischen Faktor werden abschließend in Tabelle 26 zusammengefasst.

<b><u>Her4 als Tumor-Suppressor bzw. positiver prognostischer Faktor</u></b>	<b><u>Her4 als Onkogen bzw. negativer prognostischer Faktor</u></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Bessere Prognose bei Her2/Her4-Coexpression im Vergleich zu Patientinnen mit Her2-positiven, aber Her4-negativen Tumoren.</li> <li>▪ Mammakarzinompatienten mit Her4<sup>+</sup>-Tumor sprechen besser auf Trastuzumab an<sup>65</sup>.</li> <li>▪ Her4-Expression ist mit weiteren guten Prognosefaktoren wie dem ER assoziiert<sup>73</sup>.</li> <li>▪ Patienten mit einer Überexpression von Her4 zeigen einen signifikanten Überlebensvorteil (<math>p = 0.013</math>)<sup>67</sup>.</li> <li>▪ Reduzierte Rezdivrate des ductalen Karzinoma in situ bei Her4 Expression<sup>64</sup>.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ verringertes Überleben bei nukleärem Nachweis von Her4<sup>57</sup>.</li> <li>▪ verlängertes Rezidiv freies Überleben bei verringerter Expression von ErbB4<sup>68</sup>.</li> </ul>

**Tab. 26 Übersicht über klinische Studien zur Einordnung des ErbB4-Rezeptors als prognostischen Faktor.**

Zusammenfassend lässt sich somit der ErbB4-Rezeptor als signifikanten Einflussfaktor für das Outcome und die Prognose des Mammakarzinoms postulieren, auch wenn seine Einordnung als positiver oder negativer Marker weiterhin kontrovers diskutiert wird.

#### Einfluss einer semistabilen ErbB4-Transduktion auf ein anti-Her2-Targeting mit Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib

Mit der Etablierung einer semistabilen Her4-Transduktion, die selbst keine Auswirkung auf die Proliferation, den Zellmetabolismus oder das Apoptoseverhalten hat, konnte der Einfluss von Her4 auf das Potential verschiedener zielgerichteter Therapeutika untersucht werden. Hierzu wurden die monoklonalen, anti-Her2-Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab sowie Lapatinib eingesetzt.

#### **Trastuzumab und Pertuzumab**

Da aus den Untersuchungen zum direkten und indirekten immunologisch vermittelten Potential der therapeutischen Antikörper bekannt war, dass sie keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der Mammakarzinomzellen nehmen (vgl. Kapitel 5.1 und 5.2), wurde auf die Durchführung entsprechender Annexin-Assays verzichtet und sich auf BrdU-Quenching- und XTT-Experimente beschränkt. Diese bestätigten auf Proliferations- bzw. Metabolismusebene die bekannte signifikante Wirkung einer anti-Her2 gerichteten Behandlung.

Die dynamischen Proliferationsuntersuchungen konnten einen positiven Effekt des Her4-Rezeptors auf die Ansprechrate gegenüber einer Kultivierung unter Trastuzumab herausarbeiten. So wird in BT-474 Zellen nach Transfektion mit der Her4-Splicevariante JMaCyt2 durch eine Herceptin-Behandlung in signifikant mehr Zellen ein Zellzyklusarrest induziert als in den entsprechenden Wildtyp-Klonen ( $p < 0,05$ ). In der Betrachtung der

Pertuzumabbehandlung zeigte sich ebenfalls nach Transfektion eine signifikante Zunahme des Proliferationsarrests.

In den Metabolismusuntersuchungen als XTT-Assay setzte sich der Trend der dynamischen Proliferationsuntersuchungen fort. Während Trastuzumab erneut in beiden Zellkohorten zu einer signifikanten Reduktion des Zellstoffwechsels führte, bewirkte Pertuzumab dies erst in einem signifikanten Maße bei Coexpression des ErbB4-Rezeptors.

Diese Schlussfolgerungen stehen in gewissem Einklang mit einer retrospektiven Analyse der Arbeitsgruppe Brockhoff et al., die das Gesamtüberleben von an einem Her2-positiven, metastasierten Mammakarzinom erkrankten Patientinnen untersuchte und ein signifikant besseres Outcome bei gleichzeitiger Her4-Coexpression aufzeigen konnte<sup>65</sup>. Die Interpretation, dass der zusätzliche Nachweis von ErbB4 ein positiver prädiktiver Marker für eine Behandlung mit Trastuzumab darstellt, muss jedoch derart eingeschränkt werden, als dass Patientinnen in der vergleichenden Kontrollgruppe ohne Target-spezifische Therapie ebenfalls bereits ein höheres Gesamtüberleben aufwiesen, als Her4-negative Frauen. Dies wiederum unterstreicht erneut die Einstufung von Her4 als positiven prognostischen Marker.

Der unterschiedliche Effekt einer Her4-Coexpression auf eine Behandlung mit Trastuzumab bzw. Pertuzumab kann a. e. durch folgende Thesen erklärt werden. Zum einen besitzt eine Trastuzumab-Monotherapie, wie verschiedenen klinische sowie translationale Arbeiten aufzeigten, eine höhere Effektivität im Vergleich zu einer reinen Pertuzumabbehandlung<sup>141,144,163</sup>. Dies erklärt, dass ein geringer Einfluss einer Her4-Coexpression bei letzterem Antikörper stärker in Gewicht fallen kann, da dieser durch die Herceptinwirkung möglicherweise überkompensiert wird.

Zudem besitzen beide anti-Her2-Antikörper, wie ausführlich in Abschnitt 1.4.1 erörtert, neben verschiedenen Angriffsepitopen auf der extrazellulären Her2-Domäne, auch Unterschiede in ihren Wirkmechanismen. So hemmt Pertuzumab als sog. „Her-Dimerisierungsinhibitor“<sup>139</sup> - im Gegensatz zu Trastuzumab - im besonderen Maße die laterale Signaltransduktion, indem es die Dimerisierung von Her2 mit weiteren Mitgliedern der ErbB-Familie blockiert. Entsprechend gilt das Expressionsprofil der weiteren Rezeptoren - insbesondere ErbB3 - als eine entscheidende Einflussgröße für die Sensitivität von Mammakarzinomzellen gegenüber Pertuzumab. Demnach besteht eine signifikante Assoziation zwischen einer verbesserten Pertuzumabwirkung und einer reduzierten Her3-Expression<sup>208</sup>. Dieser inverse Zusammenhang konnte auch in zwei randomisierten Studien - einer Phase II Studie von der Arbeitsgruppe um S. Makhija sowie in einer 2016 veröffentlichten doppelblinden randomisierten Phase III Studie - für Patientinnen mit einem Platin-resistenten Ovarialkarzinom gezeigt werden<sup>209,210</sup>. Vor diesem Hintergrund erscheint somit das Coexpressionsprofil für die Wirkungsweise von Pertuzumab entscheidender als für Trastuzumab.

### Lapatinib

Die durchgeführten Versuche zum Einfluss einer zusätzlichen Her4-Coexpression auf die Sensitivität von Mammakarzinomzellen gegenüber einer Lapatinibbehandlung erbrachten ebenso wegweisende Ergebnisse. So kann aus den Untersuchungen zur Apoptoseinduktion eine signifikante Steigerung der Lapatinibsensitivität nach Her4-Transfektion herausgearbeitet werden ( $p < 0,05$  für 72-stündige Behandlungsansätze). Entsprechend induzierte bereits  $0,1 \mu\text{M}$  Lapatinib in den BT-474<sub>JMaCyt2</sub> Zellen signifikant Apoptose, während in den Wildtypzellen hierzu die fünffache Konzentration notwendig war. Auch die jeweilige relative Zunahme der toten Zellen war bei Her4-Coexpression stärker ausgeprägt (Faktor 4,4 bei BT-474<sub>WT</sub> gegenüber Faktor 6,6 bei BT-474<sub>JMaCyt2</sub>).

In den dynamischen Proliferationsversuchen zur Ermittlung der Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase zeigte sich hingegen ein absoluter Sensitivitätsverlust gegenüber Lapatinib nach Transfektion des Her4-Rezeptors. In den Wildtypzellen erhöhte der duale Tyrosinkinaseinhibitor den Anteil der ruhenden Zellen um 920 %, bei vorliegender Her4-Coexpression nahm die Population dagegen nur um 810 % zu. Die statischen S-Phase-Fraktionsmessungen konnten diesen Zusammenhang zwischen der zusätzlichen Expression von ErbB4 und der Lapatinib-Sensitivität

jedoch nicht nachvollziehen. Dieses Ergebnis lässt sich a. e. mit der geringen Sensitivität dieser Untersuchungstechnik erklären.

Für den Zusammenhang zwischen einer Her4-Expression und dem Ansprechen von Mammakarzinomzellen auf eine Lapatinib-Behandlung finden sich in der Literatur kaum vergleichbare Arbeiten. Trotz allem ist von dieser Substanz bekannt, dass es in ausreichend hoher Konzentration - unabhängig von seiner Einordnung als dualer Tyrosinkinaseinhibitor des EGFR und des Her2-Rezeptors - auch Her4 hemmen kann<sup>211,212</sup>. Vor diesem Hintergrund könnte eine kompetitive Hemmung der Lapatinibwirkung an seinen beiden Hauptkinasen durch eine zusätzliche Bindung an den Her4-Rezeptor postuliert werden. Somit stünde weniger freies Lapatinib zur Hemmung der proliferativen Effekte des EGFRs und ErbB2-Rezeptors zur Verfügung, was letztlich die kleinere Zellfraktion in G0-Phase erklären könnte. Die relativ hohe eingesetzte Lapatinibkonzentration von 1  $\mu$ M steht dieser Theorie jedoch einschränkend gegenüber. Bewirkt doch bereits ein Zehntel dieser Lapatinibmenge bereits signifikante Zellveränderungen (vgl. Abb. 71).

Viel eher scheint die unterschiedliche Sensitivität nach Transfektion der JMaCyt2-Isoform auf die spezifischen Eigenschaften des Her4-Rezeptors zurückführbar. Wie die Abbildung 9 graphisch zusammenfasst, besitzt der Her4-Rezeptor die Möglichkeit in einem zweischrittigen, proteolytischen Prozess seine intrazelluläre Domäne als 4ICD freizusetzen. Diese Subdomäne fungiert schließlich ambivalent im Zellinneren. Einerseits vermag sie über die Aktivierung proapoptotischer Mechanismen Tumorzellen in den natürlichen Zelltod zu treiben. Andererseits interagiert sie direkt als Chaperon mit Promotorregionen bzw. Transkriptionsfaktoren, worauf u. a. proliferative Signale (=STAT5 oder ERE) vermehrt aktiviert werden<sup>57,58</sup>. Im Zusammenhang mit einer Lapatinibbehandlung scheint es möglich, dass nach zumindest Teilblockierung der klassischen Signaltransduktion des Her4-Rezeptors, dieser vermehrt auf diese Spezialform der Informationsübermittlung ausweicht und somit oben beschriebene Prozesse vermehrt ins Gewicht fallen. Mit der Folge, dass Mammakarzinomzellen nach einer Her4-Transduktion sensibler auf die Apoptoseinduktion durch Lapatinib reagieren, sie gleichzeitig aber desensibilisiert bzgl. der Proliferationshemmung erscheinen.

Da der XTT-Assay im weitesten Sinne beide Zelleigenschaften abbildet und hier keine Her4-Abhängigkeit erkennbar ist, kann abschließend gefolgert werden, dass sich die heterogenen Eigenschaften des Her4-Einflusses gegenseitig aufheben. Hierbei sollten jedoch noch weiterführende Untersuchungen erfolgen, da aufgrund der Anfälligkeit dieses Assays (vgl. 4.3) und der relativ hohen Lapatinibkonzentration möglicherweise geringer ausgeprägte Effekte, aufgrund der fehlenden Sensitivität nicht abgebildet werden können.

Ein abschließender Aspekt, über den der Her4-Rezeptor Einfluss auf die Wirkungsweise von Lapatinib nehmen kann, findet sich in seiner Rolle im Bereich der Resistenzentwicklung. Diese ist neben kompensatorischen Mechanismen innerhalb der ErbB-Familie auch auf ein Cross-Signaling zum Östrogenrezeptor zurückzuführen. Da der Her4-Rezeptor wiederum über seine 4ICD als potentieller Co-Aktivator des ER $\alpha$ <sup>55</sup> in diese Wechselwirkung eingreift und kann er zur Entstehung von Lapatinibresistenzen beitragen<sup>213</sup>. Entsprechend konnten Canfield und Kollegen dem Her4-Signaling eine neue und vielsprechende Rolle in der Resistenzentwicklung von Her2-positiven Mammakarzinomzellen gegenüber einer Therapie mit Lapatinib zuschreiben<sup>214</sup>. Sie beobachteten experimentell, dass Her2-Inhibitoren auch in Her2<sup>+</sup>-Brustkrebszellen, die durch eine Langzeitlapatinibtherapie eine sekundäre Resistenz entwickelten, effektiv die Autophosphorylierung von ErbB2 blockieren. Aus diesen Daten postulierten die Forscher, dass die resistenten Zellen über die Aktivierung alternativer Kinase-Signalwege proliferative Signale erhalten. Letztlich konnte die nachgeschalteten Signalkaskaden des Her4-Rezeptors als ursächliches Überlebensbackup identifiziert werden. So führt die dauerhafte Blockade der onkogenen EGFR- und Her2-Signale zu einer Querverschaltung zwischen dem Her4-Rezeptor und überlebenswichtigen Kaskadewegen, wie PI3K / AKT. Außerdem scheint eine erworbene Resistenz mit einer konsekutiven Her4-Überexpression assoziiert zu sein. Interessanterweise konnte diese Arbeitsgruppe jedoch keinen Zusammenhang zwischen einer Her4-Überexpression bei Her2<sup>+</sup>-Brustkrebs und einer verminderten Ansprechrate gegenüber einer anti-Her2 gerichteten Therapie erkennen. Ursächlich scheint, dass der Her4-Rezeptor zwar eine Ausweichmöglichkeit zum Überleben behandelter Zellen bietet, dieser Mechanismus aber erst durch eine Verschaltung zu aktivieren ist und somit eine untergeordnete

Funktion besitzt. Zusammenfassend ordneten Canfield et al. somit ErbB4 zwar eine entbehrliche Rolle in sensiblen Zellen zu, weisen ihm aber andererseits eine Schlüsselrolle bzgl. dem Zellüberleben unter dauerhafter spezifischer Blockade von EGFR und Her2 zu.

#### Einfluss einer semistabilen ErbB4-Transduktion auf eine anti-ER-Targeting mit Tamoxifen

Auch zum Zusammenhang zwischen dem Expressionsniveau des Her4-Rezeptors und dem Ansprechen von Mammakarzinomzellen auf eine endokrine Therapie mit Tamoxifen lassen sich in der Literatur unterschiedliche und z. T. widersprüchliche Thesen und Ergebnisse finden.

Einerseits konnte A. Naresh 2008 aufzeigen, dass in vitro die Suppression von Her4 in den Zelllinien MCF7 und T47D zu einer Tamoxifen-Resistenz führt<sup>76</sup>. Zellbiologisch führt sie dies u. a. auf die Rolle von 4ICD, der löslichen intrazellulären Domäne von Her4 JMa, als wichtigen Mediator der Tamoxifen-induzierte Apoptose zurück. Durch die tamoxifenvermittelte Blockade der Ausbildung eines Transkriptionskomplexes aus dem Östrogenrezeptor und 4ICD kommt es zu einer Anhäufung von Letzterem in den Mitochondrien und somit zur Aktivierung des unter 1.2.4.3 beschriebenen Apoptosemechanismus<sup>49,53,76</sup>. Vor diesem Hintergrund erklärt sich auch der Zusammenhang zwischen einer verbesserten Patientenprognose und dem Nachweis der zytosolischen 4ICD, den Thor et al. in einer retrospektiven Analyse herausarbeiten konnte<sup>58</sup>. Im Jahr 2014 konnte S. Fujiwara dies insbesondere für den intranukleären Nachweis dieser Her4-Domäne, besonders in der CYT2 Splicevariante, bestätigen<sup>74</sup>.

Ähnlich lässt sich die Beobachtung interpretieren, dass eine enge inverse Korrelation zwischen der Her4- und der Östrogenrezeptor-Expression existieren kann, da mit dem Targetverlust (=ER) Tamoxifen seine Wirksamkeit verliert. Auch wenn in der Literatur eher ein gegenteiliger Zusammenhang beschrieben ist<sup>57,75</sup>, konnte dies in den durchflusszytometrischen Untersuchungen zu den verschieden stark Her4-exprimierenden ZR-75.1 Zellen (vgl. Einschub aus Kapitel 5.3.3) aufgezeigt werden.

Eine 2015 veröffentlichte klinische Studie an über 900 Brustkrebspatientinnen zeigte hingegen keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der nachweisbaren Menge an Her4 und der Gesamtprognose unter Tamoxifentherapie<sup>75</sup>.

Andererseits schreiben etliche andere Autoren einer Her4-Expression eher eine hemmende Wirkung bzgl. des Ansprechens auf Tamoxifen zu<sup>55,58,215</sup>. Zellbiologisch kann dieser Zusammenhang auf das direkte Interaktionspotential zwischen der 4ICD des ErbB4 und dem intrazellulär lokalisierten Östrogenrezeptor zurückgeführt werden<sup>55</sup>. Folge einer vermehrten Her4-Expression, v. a. in der JMa-Isoform, ist eine ebenso verstärkte Abspaltung seiner intrazellulären Domäne, die in einem Komplex mit dem ER $\alpha$  einen starken transkriptionalen Ko-Regulator bildet<sup>57,66</sup>. Dieser aktiviert schließlich nach selektiver Bindung an ERE-haltige Genpromotoren nachgeschaltete Signalwege der Zellproliferation oder Differenzierung. Klinisch resultierenden die proliferativen Signale schließlich in einer abgeschwächten Tamoxifenwirkung.

Auch scheint die Her4-Expression selbst über das ERE-Promotor-haltige ErbB4-Gen durch Estrogen induzierbar. Stimuliert man etwa die Her4<sup>+</sup>-Zelllinie T47D mit Östrogen lässt sich eine signifikante Steigerung der ErbB4-mRNA vermessen. Im Umkehrschluss postulieren Zhu et al. einen autokrinen ER/ErbB4-Signalkreis, nach dem der ErbB4-Rezeptor seine eigene Estrogen-stimulierte Expression regulieren und somit wiederum die Proliferation von Brustkrebszellen induzieren kann<sup>54,55</sup>.

Auch Hutcheson et al. konnten einen Her4-vermittelten Resistenzmechanismus gegenüber einer endokrinen Therapie mit dem selektiven Östrogenrezeptor-Downregulator (SERD) Fulvestrant in vitro nachweisen. Mit der Zugabe dieses Antiöstrogens wird u. a. in BT-474 Zellen vermehrt Her4 exprimiert und phosphoryliert. Dies wiederum führt im Vergleich zu nicht endokrin-behandelten Wildtypzellen schließlich zu einem de novo Ansprechen gegenüber dem Her4-spezifischen Wachstumsfaktor Heregulin- $\beta$ 1, wobei der hierdurch induzierte proliferative Effekt die hemmende Wirkung von Fulvestrant auf die Zellproliferation vollständig aufheben kann<sup>215</sup>. Aus der Übertragung dieser Ergebnisse auf eine Tamoxifentherapie ließe sich somit schlussfolgern, dass mit der Transfektion des Her4 Rezeptor dieser durch Tamoxifen vermehrt phosphoryliert und damit

aktiviert vorliegt. Dessen proliferative Eigenschaften können schließlich die tumorsuppressive antihormonelle Wirkung kompensieren. Auch Ghayad et al. unterstrichen dieses Postulat, indem sie in vitro eine hohe Assoziation zwischen einer erworbenen endokrinen Resistenz und der Überexpression von Her4 aufzeigen konnten<sup>157</sup>.

Zu dieser Schlussfolgerung passen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Mit der Transfektion des Her4-Rezeptors in BT-474 Zellen nahm ihre Sensibilität gegenüber einem Tamoxifen-Treatment signifikant ab. Nicht nur das Ausmaß der Proliferationshemmung reduzierte sich im Vergleich zu den behandelten Wildtypzellen bei Expression von ErbB4, ebenso war die Apoptoseinduktion in den Her4 exprimierenden Zellen reduziert. In den durchgeführten BrdU-Quenching Versuchen erhöhte sich zwar in beiden Zellkohorten jeweils signifikant der Anteil der ruhenden Zellen, dennoch war diese Zunahme in den transduzierten BT-474 Zellen mit 780 % signifikant geringer als in den nicht veränderten Zellen mit 960 % ( $p = 0,05$ ). In XTT-Untersuchen ließ sich hingegen eine vergleichbare Hemmung des zellulären Metabolismus zwischen den Wildtyp- und den Her4-transduzierten Zellen vermessen.

Parallele Untersuchungen in der Arbeitsgruppe Brockhoff, in denen die Her-4 Expression von ZR-75.1 Zellen mittels siRNA herunter reguliert wurde, erbrachten vergleichbare Daten. Hier führte der Her4-Knockout zu einer signifikanten Steigerung der Sensibilität gegenüber Tamoxifen mit konsekutiv erhöhter Induktion der G<sub>0</sub>-Fraktion und Zellen in Apoptose.

## **6.3 DIE BEDEUTUNG DER NATÜRLICHEN KILLERZELLEN IN DER ANTIKÖRPER-BASIERTEN TUMORTHERAPIE**

### **Apoptoseinduktion bei Einsatz von NK 3.3 als Effektorzellen**

Die Apoptose, die physiologische Form des natürlichen Zelltodes, übernimmt entscheidende Funktionen in der humanen Homöostase. Neben Aufgaben während der Embryonalentwicklung oder bei der Involution im Kindes- und Erwachsenenalter, stellen proapoptotische Signalwege als sog. „induzierter Selbstmord“ von pathologisch geschädigten oder virusbefallenen Zellen ein Sicherheitssystem dar. Auf diese Weise wird die Entfernung entarteter Zellen sicher gestellt und damit der Entstehung von Krebs entgegen gewirkt. Entsprechend ist eine Dysregulation dieser Mechanismen häufig mit einer Tumorgenese und dessen Progress assoziiert<sup>33</sup>.

Der Einsatz von therapeutischen Antikörpern in der Tumorthherapie basiert primär auf zwei unterschiedlichen Wirkmechanismen. Zum einen vermitteln Antikörper wie Trastuzumab direkte, zelluläre Effekte, die in einer Hemmung der Zellproliferation oder des Metabolismus enden. Zum anderen können sie in Tumorzellen den natürlichen Zelltod induzieren. Dies kann neben einer direkten Apoptose auch als Komplement-abhängiger Zelltod (CDC) sowie v. a. als antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) im Zusammenspiel mit Immunzellen wie NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen oder Makrophagen erfolgen. Das relative Verhältnis dieser verschiedenen Effektorwege im onkologischen Einsatz beim Mammakarzinom ist kontroverser Gegenstand der aktuellen Literatur<sup>104,216</sup>.

Zur Einordnung des therapeutischen Potentials monoklonaler Antikörper in der Behandlung von Mammakarzinomzellen wurde als Surrogatmarker in dieser Arbeit die Apoptoseinduktion, vermittelt durch natürliche Killerzellen der Zelllinie NK 3.3, verwendet. Dies erfolgte in erster Linie über die beiden zentralen Versuchsansätze: Dem impedanzbasierten xCelligence-System zur kinetischen Beurteilung der Zelleliminierung und mittels des durchflusszytometrischen Annexin-DAPI-Assays zur Charakterisierung der zur Grunde liegenden Genese des Zellunterganges.

Insgesamt wurden jeweils drei Her2<sup>+</sup>- und Her4<sup>+</sup>-Zelllinien untersucht. Mit der Zugabe der natürlichen Killerzellen zu den Her2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen stieg in den Cokulturen der prozentuale Gehalt an apoptotischen Zellen im Versuchsverlauf stetig an und erreichte nach vier tägiger Zellinteraktion einen Maximalwert von ca. 30 % (vgl. Kapitel 5.2). Interessant ist die beobachtbare Kinetik der NK-zellvermittelten



Apoptoseinduktion. Diese begann im RT-CES bei BT-474 Zellen bereits nach ca. 6 Stunden, während sie bei JIMT-1 Zellen es erst nach ca. 20 h und somit nach einer deutlich längeren Zellinteraktion messbar war. Darüber hinaus legten die parallel durchgeführten mikroskopischen Korrelationen (vgl. Abb. 53b) nahe, dass neben der Auslösung des natürlichen Zelltodes auch Veränderungen der Tumorzellmorphologie sowie ihre Adhäsionseigenschaften zu Impedanzänderungen beitrugen. Vor dem Hintergrund der erhöhten Sensitivität des xCelligence-Systems lässt sich auch die Diskrepanz auflösen, dass durchflusszytometrisch nach 24 h Kokultur kaum ein Unterschied im Vergleich zu den reinen Mammakarzinomansätzen ermittelt werden konnte.

In der Analyse der Her4<sup>+</sup>-Mammakarzinomzellen ZR-75.1, T47D und MCF7 ergaben sich ähnliche Ergebnisse (vgl. Kapitel 5.3). Mit Zugabe der Effektorzellen kam es hier im Vergleich zu den Her2<sup>+</sup>-Zellen jedoch antikörperunabhängig zu einer deutlich stärkeren Induktion des natürlichen Zelltodes. Hier ließen sich - ebenfalls korrelierend zur Zellinteraktionszeit - bis zu 70 % Annexin<sup>+</sup>- und/oder DAPI<sup>+</sup>-Zellen vermessen, wobei zwischen den einzelnen Zelllinien z. T. deutliche Unterschiede zu erkennen waren. Während die ZR-75.1 Zellen eher reduziert auf die Kokultivierung mit NK 3.3 Zellen reagierten, kam es bei T47D und besonders bei MCF7 überproportional stark zu Veränderungen nach Zugabe der Immunzellen.

Zur Erklärung dieser differenzierten Zellreaktionen auf die zytotoxische Aktivität der NK 3.3 Zellen können mehrere veröffentlichte Thesen herangezogen werden. Zum einen bedingt der jeweilige humane Ursprung der Target- bzw. Effektorzellen ihren individuellen HLA-Serotyp. Abhängig vom konsekutiv verschieden stark ausgeprägten HLA-Mismatch ergibt sich somit ein spezifisches Ausmaß der Alloreaktivität der NK 3.3 Zellen gegenüber den Tumorzellen.

Zum anderen nimmt auch das Expressionsniveau der MHC-I-Moleküle selbst Einfluss auf die Angreifbarkeit der Tumorzellen durch das Immunsystem. Zwar gilt die Herunterregulation dieser Oberflächenproteine als klassischer Mechanismus, mittels dem pathogen-veränderte Zellen der immunologischen Erkennung durch MHC-I-abhängige zytotoxische T-Zellen entgehen können<sup>217</sup>, andererseits werden sie derart - nach der Missing self Theorie - erst für natürliche Killerzellen angreifbar<sup>93,94</sup>.

Entsprechend konnten Demanet et al. einen Verlust von HLA-Bw6 und HLA-A, bei erhaltener Expression von HLA-Bw4 nachweisen<sup>218</sup>. Das letztgenannte Antigen fungiert als Liganden für inhibitorische KIRs auf NK-Zellen und ist in der Lage bereits aktivierte natürliche Killerzellen überkompensatorisch zu deaktivieren. Auch nicht-klassischen HLA-Klasse-I Moleküle auf der Zelloberfläche von Tumorzellen werden Eigenschaften in der Resistenzentwicklung gegenüber Behandlungen mit monoklonalen Antikörpern zugeschrieben. Während in normalem Mammagewebe HLA-G nicht nachweisbar ist, beschrieben Lefebvre et al. dieses Protein in mehr als einem Drittel der Mammakarzinomen (ca. 38 %) <sup>219</sup>. Klassischerweise wird es während der Schwangerschaft von Trophoblastenzellen heraufreguliert und dient der Hemmung des maternalen Immunsystems gegenüber dem Feten<sup>104</sup>. Zellbiologisch führt HLA-G über eine Interaktion u. a. mit dem ILT-2-, dem KIR2DL4- oder weiteren Corezeptoren auf Monozyten, NK-Zellen und zytotoxischen T-Lymphozyten zu einer Inaktivierung dieser Effektorzellen, die eine zentrale Funktion in der Vermittlung des ADCC-Effektes einnehmen.

In der Literatur finden sich deutlich verschiedene Angaben zum MHC-I-Gehalt der untersuchten Mammakarzinomzellen<sup>220,221</sup>. Während die Her4<sup>+</sup>-Zelllinien ein relativ gleich hohes Expressionsniveau aufweisen, zeichnen sich die BT-474 Zellen durch einen deutlich geringeren HLA-Gehalt aus. Die JIMT-1 Zellen besitzen im Vergleich ein mittleres MHC I Expressionsprofil. Im Widerspruch zu den erhobenen Daten müssten folglich die BT-474 Zellen am sensibelsten auf die Interaktion mit den natürlichen Killerzellen reagieren, da ihre kaum vorhandenen MHC I-Moleküle nur geringe inhibitorischen Signale durch eine MHC-I/KIR-Interaktionen bedingen. Eine mögliche Erklärung dieses Paradoxons liegt möglicherweise in der Kompensation dieses Effekts durch eine ausgeprägte Unstimmigkeit der Expressionsprofile von ZR-75.1, T47D sowie MCF7 gegenüber den Killerzell-Immunoglobulin-ähnlichen Rezeptoren der NK 3.3 Zellen.

Gemäß der neueren NK-Zellwirkhypothesen mit dem „(Non-)licensing“-<sup>97</sup>, dem „induced self“-<sup>98</sup> sowie dem „Hyporesponsiveness“ Modell<sup>96</sup> nehmen auch weitere Rezeptoren auf den Tumorzellen Einfluss auf die gegen sie gerichtete Immunaktivität. So aktivieren natürliche Killerzellen beispielsweise ein unterschiedliches

Repertoire an NCRs, je nach dem welche Oberflächenliganden auf den Targetzellen erkannt werden. Hierzu zählen neben pathogenen Antigenen (z. B. virales HA und HN) auch Proteine, die in Folge von zellulärem Stress oder maligner Entartung vermehrt exprimiert werden (z. B. BAT-3, HSPG, B7-H6, A/CL oder PCNA)<sup>96,222</sup>. Somit könnte die individuellen Expressionsprofile der untersuchten Mammakarzinomzellen in einem unterschiedlichem Ausmaß neben dem konstitutiv exprimierten natürlichen Zytotoxizitätsrezeptor NKp46 zur Aktivierung weiterer Vertreter dieser Rezeptorenklassen (NKp30, NKp44 oder NKp80) führen und dadurch die Zytotoxizität der Immunzellen aktivieren<sup>96,105</sup>.

Ein dritter Aspekt über den sich die unterschiedliche Reaktion der Tumorzellen auf eine Cokultur mit den Effektorzellen erklären lässt, findet sich in den unterschiedlichen Wirkmechanismen der natürlichen Killerzellen (vgl. Kapitel 1.3.2.2). Während Mammakarzinomzellen der Zelllyse durch die Exozytose und dem enzymatischen Angriff von zytoplasmatischen Perforin- bzw. Granzym-Vesikeln<sup>103</sup> relativ homogen gegenüberstehen, sind etliche Resistenzmechanismen beschrieben, durch die Tumorzellen der Todesliganden assoziierten Apoptoseinduktion entkommen. Physiologisch aktiviert die Interaktion des FAS-Liganden (FasL) oder des „tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand“ (TRAIL) mit dem Fas-Rezeptor (= FasR, CD95) auf der Oberfläche der Zielzellen eine Caspase-Kaskade, die mit dem natürlichen Zelltod der Tumorzellen endet<sup>106</sup>. Einige Tumorarten sind jedoch in der Lage, diese FasL-FasR-Interaktion zu blockieren, indem sie ihren FasR herunterregulieren, Veränderungen in der nachgeschalteten Signalkaskade entwickeln oder große Menge an komplexierenden, löslichen FasR ausschütten<sup>223</sup>.

### **Trastuzumab und Pertuzumab assoziierter ADCC-Effekt**

Über den Mechanismus der antikörperabhängigen zelluläre Zytotoxizität vermitteln monoklonale Antikörper wie Trastuzumab und Pertuzumab in vivo den Großteil ihres therapeutischen Potentials<sup>224</sup>. Vor diesem Hintergrund sowie der auch klinisch relevanten Resistenzmechanismen gegen das direkte tumorsuppressive Potential dieser Therapeutika wurden im Rahmen dieser Arbeit die immunologisch vermittelten, indirekten Effekte näher charakterisiert und Möglichkeiten der positiven Modulation näher untersucht (vgl. Kapitel 5.2).

In den **BT-474<sub>Wildtyp</sub>** Cokulturen mit natürlichen Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 (vgl. Abb. 56) konnte nach Zugabe des monoklonalen anti-Her2-Antikörpers Trastuzumab ein signifikanter ADCC-Effekt vermessen werden. Zudem korrelierte diese Apoptoseinduktion mit der Interaktionszeit zwischen Effektor- und Targetzellen. Auch die Zugabe von Pertuzumab, das an ein anderes Epitop des ErbB2-Rezeptors bindet, führte im Vergleich zur reinen Cokultur zu einem vermehrten Anteil an avitalen BT-474<sub>Wildtyp</sub> Zellen. Wurden beide Antikörper zu den Ansätzen gegeben, ergab sich ein leicht additiver Effekt. In der statistischen Bewertung konnte jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Applikation nur eines einzelnen Antikörpers berechnet werden. Ebenso wurden die derart behandelten Zellen real-time im xCelligence-System analysiert (vgl. Abb. 53A). Hier bestätigte sich die durch Trastuzumab gesteigerte Zytotoxizität der NK 3.3 Zellen gegenüber BT-474 Zellen. Entsprechend zeigten Cokulturen nach Zugabe des Antikörpers einen deutlich steileren Abfall des normalisierten  $\Delta$ CI-Wertes.

Interessanterweise konnte mit den **resistenten BT-474** Zellen, die in vitro eine sekundäre Resistenz gegen die direkten antiproliferativen Trastuzumabeffekte entwickelt hatten, ebenso indirekte immunzellvermittelte Resultate aufgezeigt werden. Im durchflusszytometrischen Apoptoseassay (vgl. Abb. 57) ergaben sich - vergleichbar zu den Wildtypzellen - signifikante Trastuzumab assoziierte ADCC Daten. Entgegen der möglichen Erwartung, fiel die indirekte Induktion des natürlichen Zelltodes in BT-474<sub>Res</sub> Zellen durch Pertuzumab erneut niedriger, als der durch Trastuzumab, aus. Ein additiver Effekt durch die Applikation beider Antikörper konnte erneut nicht vermessen werden. In der RT-CES Untersuchung (vgl. Abb. 54) bestätigte sich für die BT-474 Zellen mit sekundärer Trastuzumabresistenz die Sensitivität gegenüber einer Herceptin-vermittelten Zytotoxizität durch NK 3.3 Zellen.

Als dritte und letzte Her2<sup>+</sup>-Mammakarzinomzelllinie wurden die als intrinsisch trastuzumabresistent beschriebenen **JIMT-1** Zellen eingesetzt. Neben der auch in unserem Labor bestätigten fehlenden Sensitivität

dieser Zelllinie gegenüber einer direkten tumorsuppressiven Behandlung mit Trastuzumab, erbrachten die Versuche zur indirekten Wirkungsweise dieses Antikörpers bei JIMT-1 ebenfalls keine signifikanten Ergebnisse (vgl. Abb. 55 und Abb. 58). Zum Teil lag der induzierte Anteil an avitalen Mammakarzinomzellen hier sogar unterhalb der der unbehandelten Cokulturen. Dieses Messergebnis ist jedoch aufgrund der ausgeprägten Standardabweichung eher als Messungsungenauigkeit statt als biologischer Effekt zu interpretieren. Barok et al. hingegen konnten in immundefizienten Tumormäusen, denen subcutan JIMT-1 Zellen transplantiert wurden, eine signifikante Wirkung durch Trastuzumab im Sinne einer ADCC-Reaktion nachweisen. Die Autoren begründen diese Schlussfolgerung u. a. mit parallelen Experimenten, in denen lediglich das F<sub>ab</sub>-Fragment von Herceptin in vivo eingesetzt wurde und das selbst zu keiner Tumorsuppression führte<sup>201</sup>.

Ähnlich wie gegen das direkte Wirkpotential von Antikörpern können Tumore eine sekundäre Resistenz gegen immunologisch vermittelte Mechanismen dieser Target-spezifischen Therapeutika entwickeln. Aufgrund der hohen genetischen Instabilität in Folge der ausgeprägten Mutations- bzw. Proliferationsraten kommt es insbesondere in maligne entarteten Zellen fortlaufend zu genetischen und phänotypischen Veränderungen. Bedingt durch die „tumorfeindlichen“ äußeren Bedingungen - nicht zuletzt durch das Immunsystem - selektionieren sich jene Tumorklone, die sich am besten an die Körperabwehr adaptierten und sich ihr durch verschiedene Escapemechanismen entziehen. Im Zusammenhang mit einer Herceptintherapie wurde beispielweise von mehreren Autoren ein herabreguliertes ErbB2-Rezeptorniveau bei Mammakarzinomzellen beobachtet. In Folge der geringer gebundene Antikörperzahl kommt somit über die fehlende Fcγ-Rezeptorinteraktion zu einem reduzierten Aktivierungssignal der natürlichen Killerzellen<sup>225</sup>. In der vorliegenden Arbeit scheint dieser Mechanismus jedoch keine tragende Rolle zu spielen, da es nach Auswertung der eigenen Daten bei BT-474 kaum zu einer Rezeptorinternalisierung kommt und zum anderen die Effektorzellen IL2-bedingt bereits im aktivierten Zustand in die Cokulturexperimente eingebracht wurden.

Entscheidender, insbesondere in der translationalen Betrachtung, scheint der Immunstatus der Patientinnen für den Erfolg einer Antikörpertherapie. Nicht nur, dass Lymphozyteninfiltration in Tumoren positiv mit dem Ansprechen beispielsweise von Trastuzumab korreliert<sup>226</sup>, auch der Aktivierungszustand der Immunzellen beeinflusst das Outcome infolge einer Antikörpertherapie. Eine vermehrte Expression von Checkpoint-Inhibitoren resultiert daher in geringeren Ansprechraten einer spezifischen anti-Her2 Behandlung<sup>227</sup>.

Auch die Tumore selbst können eine immunsuppressive Mikroumgebung schaffen. Durch die Expression von immunmodulierenden Molekülen wie E-Catherin oder der Freisetzung von immunsuppressiven Zytokinen entziehen sie sich dem Angriff der Immunzellen. Botenstoffe wie IL-6, IL-10 oder TGF-β unterdrücken hierbei die Aktivität von Monozyten, NK- oder T-Zellen<sup>228</sup>. Entsprechend erschließt sich auch, dass die Aktivität von NK-Zellen mit der Überlebenszeit von Tumorpatienten korreliert und mit fortschreitender Erkrankung abnimmt<sup>229</sup>. Für den klinischen Alltag findet sich in der Literatur jedoch ein heterogenes Bild. Einerseits konnte Arnould et al. einen positiven Zusammenhang zwischen der Konzentration von NK-Zellen im Patientenblut und einer höheren ADCC-Intensität nachweisen<sup>119</sup>, andererseits konnte die Arbeitsgruppe um T. Repka dies nicht mit dem Patientenoutcome in Verbindung bringen<sup>230</sup>. In einer im Jahr 2008 publizierten Studie konnten Beano et al. wiederum, durch den Nachweis des Zusammenhangs zwischen der Aktivität der natürlichen Killerzellen von Brustkrebspatientinnen und ihrem Ansprechen auf eine Trastuzumabtherapie, den wichtigen Einfluss der NK Zellfunktion unterstreichen<sup>231</sup>. Unabhängig von dieser heterogenen Datenlage, lässt sich jedoch für Tumorpatienten, insbesondere beim Mammakarzinom, ein niedrigerer NK-Zellgehalt aufzeigen<sup>232</sup>. Hierbei bleibt jedoch unklar, ob die fehlende zytotoxische Aktivität Folge einer eingeschränkten Zellexpansion oder eines erhöhten Verbrauchs ist.

Auch der vorliegende Polymorphismus des exprimierten Fcγ-Rezeptors der Effektorzellen, einschließlich dem FcγR IIIa bzw. CD16 der natürlichen Killerzellen, beeinflusst den klinischen Erfolg einer Behandlung mit monoklonalen Antikörpern. So konnten Weng und Levy nachweisen, dass dieser mit dem Therapieansprechen von Patienten mit follikulärem Lymphom korreliert. Aufgrund der höheren Affinität des V-Allels (Valin) gegenüber IgG1 und IgG3 im Vergleich zum F-Allel (Phenylalanin)<sup>104</sup> bedingt ein homozygoter FcγRIIIa 158v/v eine effektivere ADCC-Reaktion und entsprechende Patienten zeichnen sich durch ein besseres

Outcome mit längerer Progressionsfreiheit aus<sup>233</sup>. Zudem gelang es zwei Arbeitsgruppen diese Korrelation in einer retrospektiven Studie auch auf das Mammakarzinom zu übertragen<sup>234,235</sup>. Diesbezügliche prospektive Untersuchungen stehen zur Bestätigung dieser These jedoch bis lang noch aus.

In den letzten Jahren wurden verschiedene Möglichkeiten evaluiert diese Escapemechanismen zu umgehen und dadurch das immunologische Potential therapeutischer Antikörper zu reaktivieren. Denkbare Ansätze finden sich u. a. im direkten Transfer von NK- oder T-Zellen oder durch eine Stimulation des zellulären Immunsystems des Patienten durch Zytokine oder andere Botenstoffe. Andere Arbeitsgruppen entwickelten bispezifische Antikörper, die über die Herstellung einer direkten Interaktion zwischen Immunzellen und Tumor, dessen immunsystemtommenden Eigenschaften kompensieren.

#### Immunmodulierender Effekte von Zytokinen

An dieser Stelle sei auf die Arbeit von Caras et al. verwiesen, die bei Mammakarzinompatientinnen auch ein verringertes IFN $\gamma$ -Niveau nachweisen konnten<sup>232</sup>. Interferon- $\gamma$ , das u. a. von NK-Zellen synthetisiert wird, besitzt im Vergleich zu anderen Interferonen die größte immunmodulatorische Wirkung aller Zytokine. Zudem steigert IFN- $\gamma$  durch eine verstärkte Expression von MHC Klasse-I und -II-Antigenen auf Tumorzellen, ihre Sensitivität gegenüber einer ADCC-Reaktion<sup>236</sup>.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich demgegenüber auf die Rolle der Interleukine und ihren positiven Einfluss auf die ADCC-Effektivität von natürlichen Killerzellen. So konnten zahlreiche in vitro<sup>91,237</sup> als auch in vivo<sup>230,238</sup> Arbeiten eine verstärkte zytotoxische Aktivität sowie eine Expansion von natürlichen Killerzellen in Folge einer Interleukin-2 Behandlung aufzeigen. In einer weiterführenden klinischen Phase II Studie untersuchten Mani et al. die Folgen eines gemeinsamen Einsatzes von IL-2 und Trastuzumab für Outcome von Mammakarzinompatientinnen<sup>239</sup>. Zwar ließen sich auch hier die von Carson et al.<sup>237</sup> in vitro postulierte erhöhte NK-Zellaktivität über Surrogatparameter wie einen erhöhten IFN- $\gamma$ - und weiterer Chemokin-Spiegel vermessen, es kam jedoch nicht zu einer signifikanten Zunahme des Gesamtüberlebens. In parallelen Untersuchungen in der eigenen Arbeitsgruppe wurden darüber hinaus die NK 3.3 Zellen, die als IL-2 abhängig charakterisiert sind<sup>165</sup>, über einige Tage ohne stimulierende Interleukine kultiviert. In Folge dessen zeigten sie eine deutlich weniger ausgeprägte Zytotoxizität in unbehandelten Cokulturen mit Mammakarzinomzellen. Hierdurch wurde der induzierte ADCC-Effekt deutlicher nachweisbar.

Eine ähnlich positive Wirkung wird u. a. auch für IL-6, IL-12 und IL-15 postuliert<sup>236,240,241</sup>. Während die Applikation von IL-6 keine wesentliche Veränderung in den Cokulturexperimenten bewirkte, konnte in dieser Arbeit mit der Zugabe von IL-15 eine signifikante Steigerung des ADCC-Effektes erreicht werden (vgl. Kapitel 5.2.4).

#### Variation der Antikörperkonzentration

Sämtliche Trastuzumab- bzw. Pertuzumab-Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Antikörperkonzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt. Hierbei konnten die vorangehend diskutierten Effekte vermessen werden. Mit weiterführenden Untersuchungen mit reduzierten Antikörpermengen konnte zudem gezeigt werden, dass auch deutlich niedrigere Antikörpermenge bereits zu signifikanten Ergebnissen führen.

Die Arbeitsgruppe um DM Collins stellte der Effizienzsteigerung durch Erhöhung der Antikörperdosis jedoch limitierend das Expressionsniveau des Zielantigens gegenüber<sup>242</sup>. Zelllinien, auf deren Zelloberfläche nur sehr gering Her2 nachweisbar ist, zeigten beispielsweise mit Steigerung der zugegebenen Antikörpermengen keine erhöhte Angreifbarkeit durch NK-Zellen. Die Autoren führen dies auf eine bereits vollständige Sättigung der Epitope durch eine geringere Menge zurück.

Nichts destotrotz werden in der onkologischen Klinik deutlich höhere Trastuzumabmengen eingesetzt. Entsprechend konnten Ismael et al. eine bis zu 5 bis 7-fach höhere Wirkstoffkonzentration (51,8  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 69,0  $\mu\text{g/ml}$ ) bei Patientinnen im Serum nachweisen, die dreiwöchentlich subcutan bzw. intravenös die Antikörper erhielten<sup>243</sup>. In der s. c. Gruppe wurden hierbei jeweils 600 mg verabreicht, während die Patientinnen im i. v.-Arm dieser klinischen Studie eine Loading-Dose von 8 mg/kg Körpergewicht bekamen, die mit 6 mg/kg

Körpergewicht fortgesetzt wurde. Hierbei ist allerdings einschränkend zu überdenken, dass der Antikörpergehalt im Blut nur in eingeschränkter Weise valide Aussage über die Konzentration im Tumorgewebe oder an der einzelnen Tumorzelle ermöglicht. Sie stellt lediglich einen Surrogatmarker aufgrund der komplexen Pharmakokinetik hierfür dar.

#### Variation der Effektorzell-Targetzell-Ratio

Der Anteil der natürlichen Killerzellen im peripheren Blut beträgt etwa 6 - 15 % der Blutlymphozyten und macht damit lediglich einen sehr geringen Anteil aus. Nicht zu Letzt da in die Cokulturversuche dieser Arbeit zumeist die Effektorzellen in einem 1:1-Verhältnis eingebracht wurden, sind diese Erkenntnisse nur bedingt auf die Klinik übertragbar. Zum einen ist erneut die Immunzellkonzentration nicht im peripheren Blut, sondern an der einzelnen Tumorzelle entscheidend für die indirekten Wirkungsmechanismen der therapeutischen Antikörper, zum anderen wirken verschiedene Effekte des Mikromilieus des Tumor sowohl positiv als auch negativ modulierend auf die Angreifbarkeit. Während Chemokine, die von weiteren Immunzellen ausgeschüttet werden, Effektorzellen direkt zum Tumor leiten können, kann das tumoreigene Mikromilieu mit der Ausbildung von Barrieren, hypoxischen Bedingungen und immunsuppressiven Botenstoffen den Tumor vor dem Angriff entziehen.

Im Vergleich mit anderen Arbeiten wurden für die hier dargestellten Experimente geringe Effektor-Targetzell-Ratios eingesetzt. Bereits Kornbluth et al. haben im Rahmen der Erstbeschreibung des Zytotoxizitätspotenzials der NK 3.3 Zellen bis zu 100-fach höhere Konzentrationen dieser Zelllinie verwendet<sup>164</sup>. Auch die Arbeitsgruppe um S. Cooley arbeiteten mit einem in vitro Modell mit einem 10 : 1-Verhältnis und zeigten mit diesem erst einen suffizienten ADCC-Effekt in Folge einer Trastuzumabbehandlung<sup>244</sup>. Hierbei muss jedoch relativierend der jeweils verwendete Readout-Parameter zur Beurteilung des ADCC-Effektes bedacht werden. Die in dieser Arbeit verwendeten xCelligence- und FACS-Untersuchungen zeichnen sich durch eine i. d. R. deutlich höhere Sensitivität verglichen zu den klassischen Zellyseassays aus, die den Zelluntergang anhand von aus dem Zellinneren freigesetzten Farbstoffen oder radioaktiven Isotopen detektierten.

Abschließend sei noch auf die Veröffentlichung von Barok et al. verwiesen<sup>201</sup>. In dieser konnte auch für die als trastuzumabresistent charakterisierte JIMT-1 Zelllinie ADCC-Effekte infolge einer Herceptintherapie nachgewiesen werden. Hierzu war jedoch ein deutlich höherer Immunzeleinsatz mit einer E:T-Verhältnis größer 60:1 notwendig.

## **6.4 POTENTIAL VON ERBB4 ALS THERAPEUTISCHES TARGET**

Der von M. Hollmén im Jahr 2009 erstbeschriebene monoklonale Antikörper mAb1479 hemmt nach selektiver Bindung an die extrazelluläre Her4-Domäne der JMa Isoform sowohl die intrazelluläre Rezeptortyrosinkinaseaktivität als auch das Ektodomain-Shedding. Zudem führt dieser Antikörper über die Ubiquitinierung zum Abbau des ErbB4-Rezeptors<sup>145</sup>.

Anderes als Hollmén et al., die eine direkte tumorsuppressive Wirkung von mAb1479 auf MCF7 und T47D Zellen zeigen konnten, erbrachten sämtliche derartigen Untersuchungen in dieser Arbeit sowohl an den beiden genannten Her4<sup>+</sup>-Zelllinien als auch an ZR-75.1 Zellen keinen signifikanten Effekt (vgl. Kapitel 5.3.5). Weder die Zellproliferation, ihre Metabolismuseigenschaften noch die Zellvitalität reagierten substanziell auf die Zugabe dieses monoklonalen Antikörpers. Auch in der Kombination mit einem anti-Her2 Targeting konnte für alle drei Zellarten kein signifikanter additiver Effekt herausgearbeitet werden.

Die zugrunde liegenden Ursachen dieser Diskrepanz kann aus den selbsterhobenen bzw. veröffentlichten Daten nicht abschließend geklärt werden. Eine Begründung für dieses direkte Therapieversagen findet sich allerdings weder in einer mangelnden Expression des Zielantigens, noch in einer insuffizienten Bindung des therapeutischen Antikörpers. Bei allen drei untersuchten Her4<sup>+</sup>-Zelllinien konnte ausgeprägt ErbB4 sowie eine hochsignifikante Bindung von mAb1479 nachgewiesen werden.

Nichtdestotrotz birgt Her4, möglicherweise über andere spezifische Antikörper, Potential für den klinischen Einsatz. Nicht nur dass mit ErbB4 eine weitere Oberflächenstruktur das Portfolio der Angriffsziele erweitert und wie ausführlich in der Einleitung dargestellt eine tragende, wenn auch nicht abschließend geklärte Rolle in der Entwicklung und Prognose des Mammakarzinoms einnimmt, hält insbesondere die isoformspezifischen Eigenschaften dieses Rezeptors interessante Vorteile bereit. So darf für ein JMa spezifisches Targeting, wie es auch mAb1479 vermittelt, ein reduziertes Nebenwirkungsprofil vorausgesagt werden. Insbesondere ist zu postulieren, dass unerwünschte kardiale Effekte aufgrund der im Herzwert v. a. exprimierten JMb-Isoform deutlich seltener auftreten als bei nicht differenzierenden Antikörperklonen<sup>46</sup>.

In klinische Überlegungen sind auch Kombinationsbehandlungen einer anti-Her4 gerichteten Behandlungsstrategie mit weiteren zielgerichteten Therapeutika einzubeziehen. In diesem Zusammenhang sei auch auf die Arbeit von Thor et al. aus dem Jahr 2009 verwiesen. Hier beschreibt der Autor eine signifikante negative Beeinflussung einer endokrinen Behandlung mit Tamoxifen durch eine anti-Her4 gerichtete Therapie<sup>58</sup>. Eine mögliche zellbiologische Begründung hierzu findet sich möglicherweise im ausführlich im vorausgehenden Kapitel diskutierten Zusammenhang zwischen der Her4-Expression und dem Ansprechen auf Tamoxifen. Ebenso unterstrich Canfield et al. das Potential einer anti-Her4 gerichteten Therapie bzgl. der Überwindung einer erworbenen Resistenz gegenüber einer Her2-gerichteten Behandlung<sup>214</sup>.

Ein weiterer therapeutischer anti-Her4-Antikörper wurde 2016 unter der Bezeichnung P6-1 von Okazaki et al. vorgestellt<sup>245</sup>. Dieser monoklonale Antikörper blockiert die Rezeptoraktivierung infolge einer Stimulation mit NRG-1. Eine Her4 Aktivierung mit diesem Neuregulin scheint über eine verstärkte Zellmigration eine Schlüsselrolle in der Progression von Brustkrebs zu spielen<sup>246</sup>. Entsprechend konnte von den Autoren mit einer P6-1 Behandlung eine signifikante Hemmung eines NRG-1-induzierten Wachstums von MCF7 Kolonien nachgewiesen werden. Interessanterweise hatte dieser Antikörper allerdings keinen Effekt auf die Zellproliferation unter den üblichen in vitro Kulturbedingungen.

Die abschließenden Kapitel dieser Arbeit widmeten sich dem indirekten, immunzellvermittelten Potential von mAb1479. Diesbezüglich finden sich in der Literatur weder vergleichende Arbeiten mit in vitro Cokulturrexperimenten, noch mit in vivo Modellen.

In den eigenen Untersuchungen mit den natürlichen Killerzellen der Zelllinie NK 3.3 konnte in den durchflusszytometrischen Analysen zwar eine absolute Apoptoseinduktion im Sinne eines ADCC-Effektes gemessen werden, die statistische Bewertung erbrachte jedoch zumeist keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu unbehandelten Cokulturen. Insbesondere bei längerer gemeinsamer Kultivierung der Effektor- und Targetzellen führte die ausgesprochene Zytotoxizität der natürlichen Killerzellen zu einer Überkompensation der Antikörpervermittelten Mechanismen. In den parallel durchgeführten xCelligence-Versuchen bestätigten sich diese geringen ADCC Tendenzen.

Durch den Einsatz von murinen Immunzellen bewirkte mAb1479 hingegen eine signifikante Apoptoseinduktion im Sinne einer ADCC Reaktion. Insbesondere höhere E:T-Ratios induzierte in T47D und MCF7 Zellen nach Zugabe des monoklonalen murinen Antikörpers signifikant Apoptose.

Eine Erklärung dieser unterschiedlichen immunzellvermittelten Wirkungsstärke findet sich möglicherweise im murinen F<sub>c</sub>-Teil von mAb1479. Von vielen weiteren murinen Antikörpern ist bekannt, dass ihr klinischer Einsatz sich in der Vergangenheit, aufgrund der ausgeprägten Immunogenität und der reduzierten Interaktion mit humanen Effektorzellen, als relativ ineffizient darstellte<sup>247</sup>. Erst mit der Chimärisierung und letztlich Humanisierung der Antikörper konnten diese Nachteile deutlich reduziert und ihr therapeutisches Potential gesteigert werden<sup>248</sup>.

Andererseits ist diese Strukturveränderung häufig mit einem starken Affinitätsverlust verbunden, da der F<sub>c</sub>-Teil ebenfalls in gewisser Weise Einfluss auf die Antigenspezifität nimmt<sup>249</sup>. Vor diesem Hintergrund sind weiterführende Untersuchungen auf diesem Gebiet von Interesse. Sowohl die Adaptierung der Antikörperstruktur an humane Effektorzellen, als auch sein therapeutisches Potential in vivo gilt es weiter zu untersuchen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Seit 2006 bilden antigenspezifische Therapien in Kombination mit einer klassischen Chemotherapie eine entscheidende Komponente sowohl in der adjuvanten wie auch neoadjuvanten Behandlung von Patientinnen mit einem Her2<sup>+</sup> Brustkrebs. Trotz der intensiven Forschungsbemühungen in der vergangenen Dekade sind die Wirkmechanismen der therapeutischen Antikörper immer noch nicht vollständig geklärt.

Die dem klinischen Respons bzw. einer Resistenz zugrunde liegenden zellulären, molekularen und immunologischen Ursachen sind vielfältig und individuell unterschiedlich, wobei die Familie der ErbB-Rezeptoren hierbei, aufgrund ihrer wechselseitigen Signalverknüpfung, sicherlich eine zentrale Bedeutung einnimmt. Aufgrund seiner ambivalenten Wirkungsweise mit einerseits pro-proliferativer (tumorigener) und andererseits aber pro-apoptotischer (anti-tumorigener) Komponente, rückte der Her4-Rezeptor in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses.

Vor diesem Hintergrund war es Ziel dieser Promotionsarbeit die direkten und indirekten Wirkmechanismen einer Target-spezifischen Behandlung von Mammakarzinomzellen unter Berücksichtigung des Her2- und Her4-Rezeptorexpressionsprofils näher zu charakterisieren. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Fragestellung erläutert.

### **I. Direkte Wirkmechanismen von therapeutischen Antikörpern**

Als Ausgangspunkt für die weiterführenden Untersuchungen konnte für die therapeutischen anti-Her2 Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab auf verschiedenen zellulären Ebenen eine signifikante Tumorsuppression nachvollzogen und quantifiziert werden. Entsprechend reduzierte sich beispielsweise der Anteil der proliferierenden BT-474 Zellen von 25,3 % hochsignifikant auf 6,7 % nach einer 48-stündigen Behandlung mit 10 µg/ml Trastuzumab. Während der Zellmetabolismus in Folge einer Applikation dieses therapeutischen Antikörpers ebenfalls hochsignifikant reduziert wird, induziert er jedoch lediglich im geringem Ausmaß Apoptose. Der Anteil der avitalen Zellen steigt hierbei z. B. maximal um 3,7 Prozentpunkte auf 9,2 %. Weiterhin ließ sich in vitro die klinische Erfahrung bestätigen, dass Mammakarzinome sowohl intrinsische Resistenzen gegenüber therapeutischen Antikörpern aufweisen (JIMT-1 / ZR-75.1) oder aber auch unter Langzeittherapie z. T. desensibilisiert werden können (BT-474<sub>Resistent</sub>). Mögliche Ursachen dieser Resistenzentwicklung wurden mittels Charakterisierung des Expressionsprofil der zu therapierenden Zielantigene sowie der Antikörper-Bindungs Kapazität näher untersucht. Hierbei exprimieren die BT-474<sub>Resistent</sub> Zellen, obgleich sie auf eine Trastuzumabbehandlung nicht mehr reagieren, in einem vergleichbaren Ausmaß Her2 und verfügen über eine nicht signifikant unterschiedliche Trastuzumabbindungskapazität wie die Wildtypzellen.

### **II. Indirekte, Immunsystem-vermittelte Wirkungen von therapeutischen Antikörpern**

Im Rahmen der Etablierung der immortalen natürlichen Killerzelllinie NK 3.3 wurde diese phänotypisch und funktionell charakterisiert. Neben dem Nachweis des heterozygoten (V/F) Polymorphismus des Fcγ-Rezeptors CD16, der insgesamt bei 35,3 % der Zellen mit einem heterogenen Expressionsniveau auf der Zelloberfläche aufgezeigt werden konnte und zu einem mittelaaffinen Subtyps der IgG-Bindung führt, wurden die NK 3.3 Zellen durchflusszytometrisch als Nkp46<sup>+</sup> bei einem geringen Nachweis von CD56 beschrieben. Eine Expression von CD27 sowie der Fcγ-Rezeptoren CD32 und CD64 ließen sich hingegen nicht detektieren. Funktionell konnte intrazellulär in den natürlichen Killerzellen eine signifikante Synthese von Perforin als zentraler Wirkmechanismus angefärbt werden. In der Immunfluoreszenz gelang zudem der Nachweis einer Colokalisation dieser Effektorzellen an adhärent wachsende Mammakarzinomzellen, die als Targetzellen in eine Cokultur mit NK 3.3 eingebracht wurden.

Der hierzu neu etablierte und eingesetzte einzelzellbasierte Annexin-DAPI-Apoptose-Assay konnte wie die dynamische, real-time xCelligence-Technologie ein großes, signifikantes ADCC-Potential der therapeutischen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab aufzeigen, das sich durch gesteigerte E:T-Ratio beeinflussen ließ.

Der immunmodulatorische Ansatz mit IL-15 zeigte eine deutliche Steigerung der Apoptoserate und gibt damit Hinweise auf mögliche klinische Ansätze. Interessanterweise wird bereits mit der relativ niedrigen Trastuzumabkonzentration von 1,0 µg/ml im Vergleich zu der ansonsten verwendeten zehnfachen Dosis ein gesättigter ADCC-Effekt erreicht.

### **III. Prädiktive Bedeutung des ErbB4-Rezeptors**

Aufgrund der engen subzellulären Vernetzung der Signalwegen der Rezeptoren der ErbB-Familie untereinander und mit weiteren wichtigen Oberflächenrezeptoren des Mammakarzinoms, wie dem Östrogenrezeptor (ER $\alpha$ ), war es eine weitere wichtige Fragestellung dieser Arbeit, den prädiktiven Stellenwert einer Expression des Her4-Rezeptors - nicht zuletzt aufgrund seiner ambivalenten Funktionsweise - für zielspezifische anti-Her2 bzw. anti-ER Therapieoptionen zu eruieren. Für diese Untersuchungen wurden die klinisch etablierten Substanzen Lapatinib und Tamoxifen sowie die therapeutischen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab eingesetzt.

Anhand von Zellen, die nach epigenetischer Reaktivierung oder semistabiler retroviraler Transfektion den ErbB4-Rezeptor exprimieren, konnte die enge Assoziation der Her4-Coexpression und einer anti-Her2 bzw. anti-ER gerichteten Behandlung aufgezeigt werden. So wiesen die transfizierten Zellen eine signifikante Desensibilisierung gegenüber einer Tamoxifen-Therapie sowohl auf der Ebene der Proliferationshemmung als auch bei der Apoptoseinduktion auf. Auch in parallelen Arbeiten in der Arbeitsgruppe Brockhoff/Wege konnte dieses Ergebnis invers, mit einer Tamoxifen-Sensibilisierung nach Knock-down des Her4-Rezeptors, bestätigt werden. Zurückzuführen scheint diese Assoziation a. e. auf die abspaltbare intrazelluläre Domäne (4ICD) des ErbB4-Rezeptors, der direkt in die Signaltransduktion von ER $\alpha$  eingreifen und als wichtiger Mediator der Tamoxifen-induzierten Apoptose hemmen kann.

Ebenso ließ sich für die Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib eine prädiktive Aussage für eine Her4-Coexpression ableiten. Aus den erhobenen Labordaten ergibt sich, dass eine Her4-Coexpression mit einer verbesserten Sensibilität bzgl. der Apoptoseinduktion durch Lapatinib vergesellschaftet ist. Interessanterweise deuten die Versuchsergebnisse andererseits daraufhin, dass die Her4-Transfektion jedoch zu einem reduzierten Zellzyklusarrest in Folge der Behandlung mit diesem dualen Tyrosinkinaseinhibitor führt.

Für ein verbessertes therapeutisches Potential der monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab ergeben sich bei einer bestehenden Her4 Coexpression aus den durchgeführten Experimenten ebenfalls Hinweise, wobei sich das größere Ansprechen sowohl auf die Hemmung der Zellproliferation als auch den Zellmetabolismus erstreckt.

Damit zeigt sich aus den in vitro Ergebnissen dieser Arbeit eine unterschiedliche prognostische Bedeutung abhängig von den eingesetzten Behandlungsansätzen, der zusätzlich sicher auch von unterschiedlicher Co-Expression der ErbB4- und Östrogenrezeptoren in vivo beeinflusst wird. Diese unterschiedliche Einordnung als positiven oder negativen prognostischen Marker für Mammakarzinompatientinnen spiegelt sich auch in den kontroversen Ergebnissen aus klinischen Studien wider.

### **IV. ErbB4 als therapeutisches Target**

Im Fokus des letzten Abschnitts dieser Arbeit stand die Beantwortung der Frage, ob sich der ErbB4-Rezeptor selbst als mögliches Zielantigen einer Antikörpertherapie eignen würde. Obwohl in Vorversuchen sowohl die signifikante Her4-Expression als auch die Bindung des monoklonalen, anti-Her4 Antikörpers mAb1479 an die drei Mammakarzinomzelllinien ZR-75.1, T75D und MCF7 bestätigt werden konnte, zeigte sich in der Evaluierung des direkten zellulären Potentials dieses therapeutischen Antikörpers kaum ein ausgeprägter Effekt. Lediglich der zelluläre Metabolismus reduzierte sich nach der Applikation von mAb1479. Auf Ebene der



Proliferation bzw. der Zellvitalität war hingegen, trotz gegenteiliger Publikation, kein Unterschied erkennbar und stellt daher einen potentiellen klinischen Einsatz dieses Antikörpers in Frage.

Die weiterführenden Untersuchungen, die mAb1479 als möglichen Induktor einer immunzellvermittelten Apoptoseinduktion einordnen sollten, zeigten ein nur gering ausgeprägtes ADCC-Potential nach Coinkubation mit der humanen NK 3.3 Zelllinie für diesen anti-Her4 Antikörper. Mit Einsatz muriner Effektorzellen aus Mäusen des Inzuchtstammes CL57/BL6 konnte hingegen bei allen drei Mammakarzinomzelllinien signifikante ADCC-Effekte vermessen werden. Eine Begründung für diese unterschiedliche NK-zellvermittelte Wirkstärke findet sich vermutlich im murinen F<sub>c</sub>-Teil von mAb1479. Die Versuche zur Einordnung möglicher ADCC Effekte, die evtl. in Patientinnen zum Tragen kämen, müssten daher mit einem humanisierten mAb1479 erneut durchgeführt werden.

### **Schlussfolgerung / Ausblick**

In der Behandlung des Mammakarzinoms nimmt der ErbB2-Rezeptor schon seit langer Zeit einen zentralen prognostischen Stellenwert ein und ist, trotz klinisch auftretender Resistenzen, ein wichtiges therapeutisches Target. Die erhobenen Daten lassen eine wichtige Bedeutung der Coexpression des Her4-Rezeptors für eine gegen den ErbB2-Rezeptor gerichtete Behandlung vermuten. Aufgrund der Komplexität der zellulären Regulation und um langfristig einen klinischen Nutzen zu erarbeiten, erscheinen weitergehende Forschungsanstrengungen lohnenswert. Dazu sollte jedoch nicht nur die Bestimmung einzelner Zielstrukturen auf der Zelloberflächen, sondern vielmehr ein umfassendes Charakterisierungsprofil der Mammakarzinomzellen gemeinsam mit immunologischen und weiteren Eigenschaften der einzelnen Patientin als Grundlage für die individuelle Therapieplanung genutzt werden. Derart scheint es für die Zukunft möglich, über eine personalisierte Kombination verschiedener Therapieansätze (Chemotherapien, zielspezifische Therapeutika, Immunmodulatoren, etc.) die Prognose von Patientinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankten, nicht zu Letzt durch die suffiziente Vermeidung oder Überwindung von Resistenzen, weiter zu verbessern.

Obgleich die Langezeit unterschätzte Rolle des Immunsystem für die medikamentösen Tumorthherapie zunehmend in den Vordergrund tritt und auch mit dieser Arbeit unterstrichen werden konnte, sind valide Aussagen schwierig. Die Übertragung von in vitro bzw. ex vivo Untersuchungsergebnissen, wie sie auch hier mit den Cokulturversuchen erhoben wurden, ist auf den Menschen nur eingeschränkt möglich. Da praktische und v. a. ethische Aspekte Studien am Patienten jedoch enge Grenzen setzen, können neuartige translationale Mausmodelle, wie zum Beispiel das in der Arbeitsgruppe Brockhoff/Wege etablierte humanisierte Tumorausmodell, sinnvolle weitere Untersuchungen ermöglichen und damit die Vielschichtigkeit im menschlichen Organismus wesentlich realistischer abbilden.

Zusammenfassend bleibt somit zu postulieren, dass durch weitere translationale Übertragung von klinischer und biomedizinischer Grundlagenforschung spannende Neuerungen zu erwarten sind und diese die Prognose von Tumorpatientinnen weiter verbessern werden.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7–30.
2. Krebs in Deutschland 2009/2010, Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 9th ed. Berlin: Robert Koch-Institut, 2013. 148 S. (Gesundheitsberichterstattung für Deutschland). ISBN: 978-3-89606-221-5.
3. Ross RK, Paganini-Hill A, et al. Effect of hormone replacement therapy on breast cancer risk: estrogen versus estrogen plus progestin. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:328–32.
4. Lancaster JM, Wooster R, et al. BRCA2 mutations in primary breast and ovarian cancers. *Nat Genet* 1996;13:238–40.
5. Sellers TA, Kushi LH, et al. Effect of family history, body-fat distribution, and reproductive factors on the risk of postmenopausal breast cancer. *N Engl J Med* 1992;326:1323–9.
6. London SJ, Connolly JL, et al. A prospective study of benign breast disease and the risk of breast cancer. *JAMA* 1992;267:941–4.
7. Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics* 2004;58:903–13.
8. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990;61:203–12.
9. Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010;141:1117–34.
10. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001;411:355–65.
11. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127–37.
12. Carpenter G, King L JR, Cohen S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. *Nature* 1978;276:409–10.
13. Barbacci EG, Guarino BC, et al. The structural basis for the specificity of epidermal growth factor and heregulin binding. *J Biol Chem* 1995;270:9585–9.
14. Zhang H, Berezov A, et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest* 2007;117:2051–8.
15. Warren CM, Landgraf R. Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell Signal* 2006;18:923–33.
16. Olayioye MA, Neve RM, et al. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000;19:3159–67.
17. Ogiso H, Ishitani R, et al. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 2002;110:775–87.
18. Yu X, Sharma KD, et al. Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol Biol Cell* 2002;13:2547–57.
19. Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003;284:54–65.
20. Songyang Z, Shoelson SE, et al. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 1993;72:767–78.
21. Lemmon MA, Schlessinger J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* 1994;19:459–63.
22. Garrett TPJ, McKern NM, et al. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 2003;11:495–505.
23. Roskoski R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:1–11.
24. Graus-Porta D, Beerli RR, et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997;16:1647–55.
25. Kraus MH, Issing W, et al. Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:9193–7.
26. Holbro T, Beerli RR, et al. The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8933–8.
27. Olayioye MA, Graus-Porta D, et al. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 1998;18:5042–51.
28. Olayioye MA. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Res.* 2001;3:385–9.
29. Kolch W, Kotwaliwale A, et al. The role of Raf kinases in malignant transformation. *Expert Rev Mol Med* 2002;4:1–18.
30. Dobashi Y, Suzuki S, et al. EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. *Mod Pathol* 2009;22:1328–40.
31. Nguyen H, Ramana CV, et al. Roles of phosphatidylinositol 3-kinase in interferon-gamma-dependent phosphorylation of STAT1 on serine 727 and activation of gene expression. *J Biol Chem* 2001;276:33361–8.
32. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:505–16.
33. Stern DF. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res* 2003;284:89–98.
34. Di Fiore PP, Pierce JH, et al. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* 1987;237:178–82.
35. Di Fiore PP, Pierce JH, et al. Overexpression of the human EGF receptor confers an EGF-dependent transformed phenotype to NIH 3T3 cells. *Cell* 1987;51:1063–70.
36. Larco JE de, Todaro GJ. Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol* 1978;94:335–42.
37. atlasgeneticsoncology.org. atlasgeneticsoncology.org, 2016. (Accessed February 28, 2016, at <https://www.google.de/#q=atlasgeneticsoncology.org>).
38. Downward J, Yarden Y, et al. Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 1984;307:521–7.

39. Salomon DS, Brandt R, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995;19:183–232.
40. Rajkumar T, Gullick WJ. The type I growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:3–9.
41. Slamon DJ, Clark GM, et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177–82.
42. Gabos Z, Sinha R, et al. Prognostic significance of human epidermal growth factor receptor positivity for the development of brain metastasis after newly diagnosed breast cancer. *J Clin Oncol* 2006;24:5658–63.
43. Christianson TA, Doherty JK, et al. NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* 1998;58:5123–9.
44. Berry DA, Cronin KA, et al. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1784–92.
45. Plowman GD, Culouscou JM, et al. Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:1746–50.
46. Junttila TT, Sundvall M, et al. ErbB4 and Its Isoforms: Selective Regulation of Growth Factor Responses by Naturally Occurring Receptor Variants. *Trends in Cardiovascular Medicine* 2000;10:304–10.
47. Gilmour LM, Macleod KG, et al. Expression of erbB-4/HER-4 growth factor receptor isoforms in ovarian cancer. *Cancer Res* 2001;61:2169–76.
48. Vecchi M, Baulida J, Carpenter G. Selective cleavage of the heregulin receptor ErbB-4 by protein kinase C activation. *J Biol Chem* 1996;271:18989–95.
49. Vidal GA, Naresh A, et al. Presenilin-dependent gamma-secretase processing regulates multiple ERBB4/HER4 activities. *J Biol Chem* 2005;280:19777–83.
50. Maija Hollmén. Role of ErbB2 and ErbB4 in Cancer Growth, Prognosis and as Targets for Immunotherapy. 2010.
51. Sundvall M, Iljin K, et al. Role of ErbB4 in Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:259–68.
52. Elenius K, Choi CJ, et al. Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 1999;18:2607–15.
53. Jones FE. HER4 intracellular domain (4ICD) activity in the developing mammary gland and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008;13:247–58.
54. Williams CC, Allison JG, et al. The ERBB4/HER4 receptor tyrosine kinase regulates gene expression by functioning as a STAT5A nuclear chaperone. *J Cell Biol* 2004;167:469–78.
55. Zhu Y, Sullivan LL, et al. Coregulation of estrogen receptor by ERBB4/HER4 establishes a growth-promoting autocrine signal in breast tumor cells. *Cancer Res* 2006;66:7991–8.
56. Sundvall M, Veikkolainen V, et al. Cell death or survival promoted by alternative isoforms of ErbB4. *Mol Biol Cell* 2010;21:4275–86.
57. Junttila TT, Sundvall M, et al. Cleavable ErbB4 isoform in estrogen receptor-regulated growth of breast cancer cells. *Cancer Res* 2005;65:1384–93.
58. Thor AD, Edgerton SM, Jones FE. Subcellular localization of the HER4 intracellular domain, 4ICD, identifies distinct prognostic outcomes for breast cancer patients. *Am J Pathol* 2009;175:1802–9.
59. Naresh A, Long W, et al. The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:6412–20.
60. Arasada RR, Carpenter G. Secretase-dependent tyrosine phosphorylation of Mdm2 by the ErbB-4 intracellular domain fragment. *J Biol Chem* 2005;280:30783–7.
61. Halasi M, Pandit B, Gartel AL. Proteasome inhibitors suppress the protein expression of mutant p53. *Cell Cycle* 2014;13:3202–6.
62. Zeng N, Liu L, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis with fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes reveals differential expression of the four ERBB4 juxtamembrane region variants between medulloblastoma and pilocytic astrocytoma. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2009;35:353–66.
63. Kountourakis P, Pavlakis K, et al. Prognostic significance of HER3 and HER4 protein expression in colorectal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2006;6:46.
64. Barnes NLP, Khavari S, et al. Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin Cancer Res* 2005;11:2163–8.
65. Sassen A, Diermeier-Daucher S, et al. Presence of HER4 associates with increased sensitivity to Herceptin™ in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11:R50.
66. Machleidt A, Buchholz S, et al. The prognostic value of Her4 receptor isoform expression in triple-negative and Her2 positive breast cancer patients. *BMC Cancer* 2013;13:437.
67. Witton CJ, Reeves JR, et al. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003;200:290–7.
68. Bieche I, Onody P, et al. Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003;106:758–65.
69. Lodge AJ, Anderson JJ, et al. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *J Clin Pathol* 2003;56:300–4.
70. Srinivasan R, Gillett CE, et al. Nuclear expression of the c-erbB-4/HER-4 growth factor receptor in invasive breast cancers. *Cancer Res* 2000;60:1483–7.
71. Esteva FJ, Hortobagyi GN, et al. Expression of erbB/HER receptors, heregulin and P38 in primary breast cancer using quantitative immunohistochemistry. *Pathol Oncol Res* 2001;7:171–7.
72. Veikkolainen V, Vaparenta K, et al. Function of ERBB4 is determined by alternative splicing. *Cell Cycle* 2011;10:2647–57. (<http://www.landesbioscience.com/journals/cc/article/17194/>).
73. Kew TY, Bell JA, et al. c-erbB-4 protein expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 2000;82:1163–70.

74. Fujiwara S, Hung M, et al. The localization of HER4 intracellular domain and expression of its alternately-spliced isoforms have prognostic significance in ER+ HER2- breast cancer. *Oncotarget* 2014;5:3919–30.
75. Gothlin Eremo A, Tina E, et al. HER4 tumor expression in breast cancer patients randomized to treatment with or without tamoxifen. *Int J Oncol* 2015;47:1311–20.
76. Naresh A, Thor AD, et al. The HER4/4ICD estrogen receptor coactivator and BH3-only protein is an effector of tamoxifen-induced apoptosis. *Cancer Res* 2008;68:6387–95.
77. Portier BP, Minca EC, et al. HER4 expression status correlates with improved outcome in both neoadjuvant and adjuvant Trastuzumab treated invasive breast carcinoma. *Oncotarget* 2013;4:1662–72.
78. Mohd Nafi SN, Generali D, et al. Nuclear HER4 mediates acquired resistance to trastuzumab and is associated with poor outcome in HER2 positive breast cancer. *Oncotarget* 2014;5:5934–49.
79. Murphy K, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. 9th ed. New York, NY: Garland Science/Taylor & Francis Group, LLC, 2016. pages. ISBN: 0815345054.
80. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* 2009;457:557–61.
81. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004;4:11–22.
82. Saksela E, Timonen T, et al. Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. *Immunol Rev* 1979;44:71–123.
83. Timonen T, Ranki A, et al. Human natural cell-mediated cytotoxicity against fetal fibroblasts. III. Morphological and functional characterization of the effector cells. *Cell Immunol* 1979;48:121–32.
84. Lanier LL, Le AM, et al. The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 1986;136:4480–6.
85. Roothans D, Smits E, et al. CD56 marks human dendritic cell subsets with cytotoxic potential. *Oncoimmunology* 2013;2:e23037.
86. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005;23:225–74.
87. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunol Rev* 2010;236:83–94.
88. Cooper M, Fehniger T, Caligiuri M. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001;22:633–40.
89. Perussia B. Fc receptors on natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998;230:63–88.
90. Cooper MA, Fehniger TA, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001;97:3146–51.
91. Baume DM, Robertson MJ, et al. Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells. *Eur J Immunol* 1992;22:1–6.
92. Caligiuri MA. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *Journal of Experimental Medicine* 1990;171:1509–26.
93. Karre K, Ljunggren HG, et al. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986;319:675–8.
94. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990;11:237–44.
95. Ljunggren H-G, Malmberg K-J. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 2007;7:329–39.
96. Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 2006;6:520–31.
97. Kim S, Poursine-Laurent J, et al. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005;436:709–13.
98. Bottino C, Castriconi R, Moretta A. Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol* 2005;26:221–6.
99. Lanier LL. Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol* 1998;452:13–8.
100. Ulbrecht M, Modrow S, et al. Interaction of HLA-E with peptides and the peptide transporter in vitro: implications for its function in antigen presentation. *J Immunol* 1998;160:4375–85.
101. Wu J, Song Y, et al. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 1999;285:730–2.
102. Halftack GG, Elboim M, et al. Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J Immunol* 2009;182:2221–30.
103. Trapani J, Smyth M. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;7:35–47.
104. Iannello A, Ahmad A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:487–99.
105. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 2006;118:1–10.
106. Zama L, Ahmad M, et al. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 1998;188:2375–80.
107. Ishigami S, Natsugoe S, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000;88:577–83.
108. Hyakudomi M, Matsubara T, et al. Increased expression of fractalkine is correlated with a better prognosis and an increased number of both CD8+ T cells and natural killer cells in gastric adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008;15:1775–82.
109. Brand J-M, Meller B, et al. Kinetics and organ distribution of allogeneic natural killer lymphocytes transfused into patients suffering from renal cell carcinoma. *Stem Cells Dev* 2004;13:307–14.
110. Khakoo SI, Thio CL, et al. HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection. *Science* 2004;305:872–4.
111. Morandi B, Bramanti P, et al. Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacol Res* 2008;57:1–5.
112. Baselga J, Swain SM. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer* 2009;9:463–75.
113. Gagliato DM, Jardim DL, et al. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget* 2016.

114. Yakes FM, Chinratanalab W, et al. Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 2002;62:4132–41.
115. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol* 2012;2012:428062.
116. Baselga J, Tripathy D, et al. Phase II study of weekly intravenous trastuzumab (Herceptin) in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *Semin Oncol* 1999;26:78–83.
117. Nagata Y, Lan KH, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 2004;6:117–27.
118. Pegram M, Hsu S, et al. Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 1999;18:2241–51.
119. Arnould L, Gelly M, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* 2006;94:259–67.
120. Romond EH, Perez EA, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353:1673–84.
121. Slamon DJ, Leyland-Jones B, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001;344:783–92.
122. Viani GA, Afonso SL, et al. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer* 2007;7:153.
123. Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und Deutschen Krebshilfe e. V. Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL Kurzversion 3.0, 2012. 104 p.
124. Tan-Chiu E, Yothers G, et al. Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2005;23:7811–9.
125. Am Feldman, Lorell BH, Reis SE. Trastuzumab in the treatment of metastatic breast cancer, Anticancer therapy versus cardiotoxicity. *Circulation* 2000;102:272–4.
126. Cardinale D, Sandri MT, et al. Left ventricular dysfunction predicted by early troponin I release after high-dose chemotherapy. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:517–22.
127. Vu T, Claret FX. Trastuzumab: updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Front Oncol* 2012;2:62.
128. Huszno J, Nowara E. Risk factors for disease progression in HER2-positive breast cancer patients based on the location of metastases. *Prz Menopauzalny* 2015;14:173–7.
129. Nagy P, Friedlander E, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res* 2005;65:473–82.
130. Kamikawa Y, Kanmura Y, et al. Combination of MUC1 and MUC4 expression predicts clinical outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2015;20:298–307.
131. Diermeier S, Horvath G, et al. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res* 2005;304:604–19.
132. Chen X, Yeung TK, Wang Z. Enhanced drug resistance in cells coexpressing ErbB2 with EGF receptor or ErbB3. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;277:757–63.
133. Pietras RJ, Arboleda J, et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995;10:2435–46.
134. Ocana A, Cruz JJ, Pandiella A. Trastuzumab and antiestrogen therapy: focus on mechanisms of action and resistance. *Am J Clin Oncol* 2006;29:90–5.
135. Berns K, Horlings HM, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* 2007;12:395–402.
136. Kataoka Y, Mukohara T, et al. Association between gain-of-function mutations in PIK3CA and resistance to HER2-targeted agents in HER2-amplified breast cancer cell lines. *Ann Oncol* 2010;21:255–62.
137. Zhang S, Huang WC, et al. Combating trastuzumab resistance by targeting SRC, a common node downstream of multiple resistance pathways. *Nat Med* 2011;17:461–9.
138. Capelan M, Pugliano L, et al. Pertuzumab: new hope for patients with HER2-positive breast cancer. *Ann Oncol* 2013;24:273–82.
139. Adams CW, Allison DE, et al. Humanization of a recombinant monoclonal antibody to produce a therapeutic HER dimerization inhibitor, pertuzumab. *Cancer Immunol Immunother* 2006;55:717–27.
140. Gianni L, Pienkowski T, et al. Efficacy and safety of neoadjuvant pertuzumab and trastuzumab in women with locally advanced, inflammatory, or early HER2-positive breast cancer (NeoSphere): a randomised multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:25–32.
141. Dawood S, Sirohi B. Pertuzumab: a new anti-HER2 drug in the management of women with breast cancer. *Future Oncol* 2015;11:923–31.
142. Gollamudi J, Parvani JG, et al. Neoadjuvant therapy for early-stage breast cancer: the clinical utility of pertuzumab. *Cancer Manag Res* 2016;8:21–31.
143. Schneeweiss A, Chia S, et al. Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). *Ann Oncol* 2013;24:2278–84.
144. Swain SM, Kim S-B, et al. Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): Overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *The Lancet Oncology* 2013;14:461–71.

145. Hollmén M, Määttä JA, et al. Suppression of breast cancer cell growth by a monoclonal antibody targeting cleavable ErbB4 isoforms. *Oncogene* 2009;28:1309–19.
146. Konecny GE, Pegram MD, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 2006;66:1630–9.
147. Rana P, Sridhar SS. Efficacy and tolerability of lapatinib in the management of breast cancer. *Breast Cancer (Auckl)* 2012;6:67–77.
148. Nahta R, Yuan LXH, et al. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol Cancer Ther* 2007;6:667–74.
149. Bartsch R, Berghoff A, et al. Impact of anti-HER2 therapy on overall survival in HER2-overexpressing breast cancer patients with brain metastases. *Br J Cancer* 2012;106:25–31.
150. Geyer CE, Forster J, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2006;355:2733–43.
151. Leary AF, Drury S, et al. Lapatinib restores hormone sensitivity with differential effects on estrogen receptor signaling in cell models of human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer with acquired endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 2010;16:1486–97.
152. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:205–13.
153. Love RR. Tamoxifen therapy in primary breast cancer: biology, efficacy, and side effects. *J Clin Oncol* 1989;7:803–15.
154. Shang Y, Brown M. Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 2002;295:2465–8.
155. Davies C, Godwin J, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 2011;378:771–84.
156. Desta Z, Ward BA, et al. Comprehensive evaluation of tamoxifen sequential biotransformation by the human cytochrome P450 system in vitro: prominent roles for CYP3A and CYP2D6. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:1062–75.
157. Ghayad SE, Vendrell JA, et al. Endocrine resistance associated with activated ErbB system in breast cancer cells is reversed by inhibiting MAPK or PI3K/Akt signaling pathways. *Int J Cancer* 2010;126:545–62.
158. Louie MC, Zou JX, et al. ACTR/AIB1 functions as an E2F1 coactivator to promote breast cancer cell proliferation and antiestrogen resistance. *Mol Cell Biol* 2004;24:5157–71.
159. Johnston SR, Saccani-Jotti G, et al. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Res* 1995;55:3331–8.
160. Mahfoudi A, Roulet E, et al. Specific mutations in the estrogen receptor change the properties of antiestrogens to full agonists. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4206–10.
161. Ignatov A, Ignatov T, et al. G-protein-coupled estrogen receptor GPR30 and tamoxifen resistance in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:457–66.
162. Hynes NE, Gerber HA, et al. Overexpression of the c-erbB-2 protein in human breast tumor cell lines. *J Cell Biochem* 1989;39:167–73.
163. Brockhoff G, Heckel B, et al. Differential impact of Cetuximab, Pertuzumab and Trastuzumab on BT474 and SK-BR-3 breast cancer cell proliferation. *Cell Prolif* 2007;40:488–507.
164. Kornbluth J, Flomenberg N, Dupont B. Cell surface phenotype of a cloned line of human natural killer cells. *J Immunol* 1982;129:2831–7.
165. Kornbluth J, Spear B, et al. Evidence for the role of class I and class II HLA antigens in the lytic function of a cloned line of human natural killer cells. *J Immunol* 1985;134:728–35.
166. Diermeier-Daucher S, ed. Gentechnikantrag zur Transduktion von BT474-Zellen.
167. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007;8:286–98.
168. Rivenbark AG, Jones WD, et al. DNA methylation-dependent epigenetic regulation of gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Epigenetics* 2006;1:32–44.
169. Cecconi D, Donadelli M, et al. Synergistic effect of trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine on growth inhibition of pancreatic endocrine tumour cell lines: a proteomic study. *Proteomics* 2009;9:1952–66.
170. Das PM, Thor AD, et al. Reactivation of epigenetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene* 2010;29:5214–9.
171. Rothe G. Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, eds. *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen*. Basel: Karger, 2007:27–70. ISBN: 978-3-8055-7928-5.
172. Sack U, Tárnok A, Rothe G, eds. *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen*. Basel: Karger, 2007. 1111 p. ISBN: 978-3-8055-7928-5.
173. Becton DaC. BD FACSCanto II BD FACSCanto II Flow Cytometer Reference Manual, 2006.
174. Hengst L. Cell Cycle and Cell Proliferation. Innsbruck: Medizinische Universität, 2013. (Accessed March 28, 2016, at <https://www.i-med.ac.at/imcbc/bc/lehre/LFUCellCycleRbPathway2013.pdf>).
175. Brockhoff G. DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie. In: Sack U, Tárnok A, Rothe G, eds. *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen*. Basel: Karger, 2007:604–46. ISBN: 978-3-8055-7928-5.
176. Kubbies M, Hoehn H, et al. Cell cycle analysis via BrdU-Hoechst flow cytometry—principles and applications. *Flow cytometry: advanced research and clinical applications* 1989;2:6–28.
177. Ormerod MG, Kubbies M. Cell cycle analysis of asynchronous cell populations by flow cytometry using bromodeoxyuridine label and Hoechst-propidium iodide stain. *Cytometry* 1992;13:678–85.
178. Diermeier S, Schmidt-Bruecken E, et al. Exposure to continuous bromodeoxyuridine (BrdU) differentially affects cell cycle progression of human breast and bladder cancer cell lines. *Cell Prolif* 2004;37:195–206.
179. Fadok VA, Voelker DR, et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207–16.

180. Scudiero DA, Shoemaker RH, et al. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res* 1988;48:4827–33.
181. Roche Diagnostics GmbH. Cell Proliferation Kit II (XTT), Datasheet, 2011. (Accessed January 18, 2013, at [http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3\\_5\\_3\\_21\\_1\\_6.html](http://www.roche-applied-science.com/proddata/gpip/3_5_3_21_1_6.html)).
182. Roehm NW, Rodgers GH, et al. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *J Immunol Methods* 1991;142:257–65.
183. Smith PK, Krohn RI, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150:76–85.
184. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 1984;10:203–9.
185. QIAGEN, ed. RNeasy® Mini Handbook, For purification of total RNA from animal cells., 2006. (; vol. April 2006).
186. Roche Diagnostics GmbH, ed. Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit. (; vol. September, 2010).
187. Higuchi R, Dollinger G, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10:413–7.
188. Schild TA. 7700 SDS Workshop, Einführung in die Real-Time TaqMan® PCR-Technologie. 2nd ed. Weiterstadt: Applied Biosystems GmbH.
189. Junttila TT, Laato M, et al. Identification of patients with transitional cell carcinoma of the bladder overexpressing ErbB2, ErbB3, or specific ErbB4 isoforms: real-time reverse transcription-PCR analysis in estimation of ErbB receptor status from cancer patients. *Clin Cancer Res* 2003;9:5346–57.
190. Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics. 7th ed. Berlin: Springer Spektrum, 2013. 298 p. (Der Experimentator). ISBN: 978-3-642-34635-4.
191. Koene HR, Kleijer M, et al. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 1997;90:1109–14.
192. Haas M de, Koene HR, et al. A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gammaRIIIa. *J Immunol* 1996;156:2948–55.
193. Giaever I, Keese CR. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:3761–4.
194. Solly K, Wang X, et al. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Technol* 2004;2:363–72.
195. Roche Diagnostics GmbH. xCELLigence System, 2012.
196. [www.aceabio.com](http://www.aceabio.com). <http://www.aceabio.com/wp-content/uploads/xCELLigence-Tech-Overview-Fig-2A.jpg>, 2016. (Accessed April 19, 2016, at [www.aceabio.com](http://www.aceabio.com)).
197. Glamann J, Hansen AJ. Dynamic detection of natural killer cell-mediated cytotoxicity and cell adhesion by electrical impedance measurements. *Assay Drug Dev Technol* 2006;4:555–63.
198. Chamber-Slide Zellkulturgefäß, S\_8082X\_Slide\_8well\_RGB.jpg (JPEG-Grafik, 450 × 337 Pixel), 2014. (Accessed January 13, 2016, at [http://ibidi.com/xtproducts/media/images/category/popup/S\\_8082X\\_Slide\\_8well\\_RGB.jpg](http://ibidi.com/xtproducts/media/images/category/popup/S_8082X_Slide_8well_RGB.jpg)).
199. Tanner M, Kapanen AI, et al. Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2004;3:1585–92.
200. Liang K, Lu Y, et al. Sensitization of breast cancer cells to radiation by trastuzumab. *Mol Cancer Ther* 2003;2:1113–20.
201. Barok M, Isola J, et al. Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2065–72.
202. Bailey TA, Luan H, et al. Mechanisms of Trastuzumab resistance in ErbB2-driven breast cancer and newer opportunities to overcome therapy resistance. *J Carcinog* 2011;10:28.
203. Mohsin SK, Weiss HL, et al. Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* 2005;23:2460–8.
204. Kute T, Lack CM, et al. Development of Herceptin resistance in breast cancer cells. *Cytometry A* 2004;57:86–93.
205. Koninki K, Barok M, et al. Multiple molecular mechanisms underlying trastuzumab and lapatinib resistance in JIMT-1 breast cancer cells. *Cancer Lett* 2010;294:211–9.
206. Lee HJ, Seo AN, et al. Prognostic and predictive values of EGFR overexpression and EGFR copy number alteration in HER2-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2015;112:103–11.
207. Sartor CI, Zhou H, et al. Her4 mediates ligand-dependent antiproliferative and differentiation responses in human breast cancer cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:4265–75.
208. Sendur MAN, Aksoy S, et al. Is HER2 overexpression sufficient for optimal response to Pertuzumab? *Med Oncol* 2012;29:2565–6.
209. Makhija S, Amler LC, et al. Clinical activity of gemcitabine plus pertuzumab in platinum-resistant ovarian cancer, fallopian tube cancer, or primary peritoneal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28:1215–23.
210. Kurzeder C, Bover I, et al. Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Phase III Trial Evaluating Pertuzumab Combined With Chemotherapy for Low Tumor Human Epidermal Growth Factor Receptor 3 mRNA-Expressing Platinum-Resistant Ovarian Cancer (PENELOPE). *J Clin Oncol* 2016;34:2516–25.
211. Brignola PS, Lackey K, et al. Comparison of the biochemical and kinetic properties of the type 1 receptor tyrosine kinase intracellular domains. Demonstration of differential sensitivity to kinase inhibitors. *J Biol Chem* 2002;277:1576–85.
212. Qiu C, Tarrant MK, et al. Mechanism of activation and inhibition of the HER4/ErbB4 kinase. *Structure* 2008;16:460–7.
213. Ni Y, Zhang S. Erbb4 Signaling: an overlooked backup system? *Cell Cycle* 2015;14:1623.
214. Canfield K, Li J, et al. Receptor tyrosine kinase ERBB4 mediates acquired resistance to ERBB2 inhibitors in breast cancer cells. *Cell Cycle* 2015;14:648–55.
215. Hutcheson IR, Goddard L, et al. Fulvestrant-induced expression of ErbB3 and ErbB4 receptors sensitizes oestrogen receptor-positive breast cancer cells to heregulin beta1. *Breast Cancer Res.* 2011;13:R29.
216. Wang S-Y, Weiner G. Complement and cellular cytotoxicity in antibody therapy of cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2008;8:759–68.

217. Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 1999;5:178–86.
218. Demanet C, Mulder A, et al. Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack? *Blood* 2004;103:3122–30.
219. Lefebvre S, Antoine M, et al. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol* 2002;196:266–74.
220. Wan S, Pestka S, et al. Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS One* 2012;7:e32542.
221. Mostafa AA, Codner D, et al. Activation of ERalpha signaling differentially modulates IFN-gamma induced HLA-class II expression in breast cancer cells. *PLoS One* 2014;9:e87377.
222. Koch J, Steinle A, et al. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol* 2013;34:182–91.
223. Villa-Morales M, Fernandez-Piqueras J. Targeting the Fas/FasL signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2012;16:85–101.
224. Haij S de, Jansen JHM, et al. In vivo cytotoxicity of type I CD20 antibodies critically depends on Fc receptor ITAM signaling. *Cancer Res* 2010;70:3209–17.
225. Kute T, Stehle JR. Development of Trastuzumab Resistance: Is it only Signaling? In: Williams SI, Rogers CE, eds. *HER2 and cancer, Mechanism, testing, and targeted therapy*. New York: Nova Science, 2011:161–73. (Cancer etiology, diagnosis and treatments). ISBN: 978-1-61122-650-8.
226. Semino C, Martini L, et al. Adoptive immunotherapy of advanced solid tumors: an eight year clinical experience. *Anticancer Res* 1999;19:5645–9.
227. Gianni L, Bianchini G, et al. Abstract S6-7: Adaptive immune system and immune checkpoints are associated with response to pertuzumab (P) and trastuzumab (H) in the NeoSphere study. *Cancer Res* 2012;72:S6-7-S6-7.
228. Hsiao Y-W, Liao K-W, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte secretion of IL-6 antagonizes tumor-derived TGF-beta 1 and restores the lymphokine-activated killing activity. *J Immunol* 2004;172:1508–14.
229. Liljefors M, Nilsson B, et al. Natural killer (NK) cell function is a strong prognostic factor in colorectal carcinoma patients treated with the monoclonal antibody 17-1A. *Int J Cancer* 2003;105:717–23.
230. Repka T, Chiorean EG, et al. Trastuzumab and interleukin-2 in HER2-positive metastatic breast cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res* 2003;9:2440–6.
231. Beano A, Signorino E, et al. Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J Transl Med* 2008;6:25.
232. Caras I, Grigorescu A, et al. Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:1146–52.
233. Weng W-K, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003;21:3940–7.
234. Musolino A, Naldi N, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:1789–96.
235. Hurvitz S, Betting D, et al. Analysis of Fcγ Receptor IIA & IIIA Polymorphisms: Correlation with Outcome in Trastuzumab-Treated HER2/Neu Amplified Early and Metastatic Breast Cancer Patients. *Cancer Res* 2009;69:64.
236. Flieger D, Spengler U, et al. Enhancement of antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) by combination of cytokines. *Hybridoma* 1999;18:63–8.
237. Carson WE, Parihar R, et al. Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells. *Eur J Immunol* 2001;31:3016–25.
238. Recchia. Maintenance immunotherapy in metastatic breast cancer. *Oncol Rep* 1994.
239. Mani A, Roda J, et al. A phase II trial of trastuzumab in combination with low-dose interleukin-2 (IL-2) in patients with metastatic breast cancer (MBC) who have previously failed trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* 2009;117:83–9.
240. Jaime-Ramirez AC, Mundy-Bosse BL, et al. IL-12 enhances the antitumor actions of trastuzumab via NK cell IFN-gamma production. *J Immunol* 2011;186:3401–9.
241. Ni J, Miller M, et al. Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* 2012;209:2351–65.
242. Collins DM, O'Donovan N, et al. Trastuzumab induces antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in HER-2-non-amplified breast cancer cell lines. *Ann Oncol* 2012;23:1788–95.
243. Ismael G, Hegg R, et al. Subcutaneous versus intravenous administration of (neo)adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive, clinical stage I-III breast cancer (HannaH study): a phase 3, open-label, multicentre, randomised trial. *Lancet Oncol* 2012;13:869–78.
244. Cooley S, Burns LJ, et al. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol* 1999;27:1533–41.
245. Okazaki S, Nakatani F, et al. Development of an ErbB4 monoclonal antibody that blocks neuregulin-1-induced ErbB4 activation in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;470:239–44.
246. Haskins JW, Nguyen DX, Stern DF. Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration. *Sci Signal* 2014;7:ra116.
247. Hekman A, Honselaar A, et al. Initial experience with treatment of human B cell lymphoma with anti-CD19 monoclonal antibody. *Cancer Immunol Immunother* 1991;32:364–72.
248. Wright A, Morrison SL. Effect of glycosylation on antibody function: implications for genetic engineering. *Trends Biotechnol* 1997;15:26–32.
249. Jones PT, Dear PH, et al. Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 1986;321:522–5.



## 9 ERKLÄRUNG ZUR EIGENHÄNDIGEN ANFERTIGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff angeregt und deren Ausarbeitung durch ihn selbst, sowie durch Priv.-Doz. Dr. med. vet. Anja-Kathrin Wege sowie Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher aus dem Lehrstuhl für Gynäkologie und Geburtshilfe des Caritaskrankenhauses St. Josef Regensburg (Direktor: Prof. Dr. med. Olaf Ortmann) überwacht.

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Bezugsorte gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater und andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation steht. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

-----  
(Ort, Datum)

-----  
(Unterschrift)

## 10 DANKSAGUNG

Ganz besonders will ich mich bei Frau **PD Dr. med. vet. Anja-Kathrin Wege** und Herrn **Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff** für die Möglichkeit bedanken, dass ich diese Promotionsarbeit in ihrer Arbeitsgruppe durchführen konnte. Bedanken möchte ich mich auch für die interessante Themenstellung und die stets hervorragende Betreuung sowohl während der experimentellen Laborarbeit als auch während der schriftlichen Ausarbeitung. Die zahllosen Ratschläge, die interessanten Diskussionen und richtungsweisenden Hinweise erleichterten mir meine wissenschaftliche Arbeit enorm und werden mir sicherlich auch bei weiteren Forschungsbemühungen in der Zukunft von großem Nutzen sein. Vielen Dank für alle Ermutigungen, die überaus freundliche und kollegiale Unterstützung.

Des Weiteren gilt mein Dank Frau **PD Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher** für die lehrreiche Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten in der Anfangsphase meiner Promotionsarbeit und die weiterführende konstruktive Betreuung.

Ebenfalls zu tiefem Dank verpflichtet bin ich der gesamten Arbeitsgruppe zytometrische und zelluläre Onkologie: Hervorzuheben sind hier Herr **Gerhard Piendl** für seine immer kameradschaftliche Zusammenarbeit in der Zellkultur und am Durchflusszytometer. Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau **Marietta Bock** bedanken, die mich unermüdlich bei der Transfektion der Zelllinien, der Anfertigung der Western-Blots und bei mikroskopischen Fragestellungen unterstützte. Außerdem gilt mein besonderer Dank Frau **Mareile Siebörger** und Frau **Teresa Leist** für Ihre Einführung und Unterstützung im Umgang mit den in vivo Techniken, unseren Labormäusen und den Primärmaterialien. Bedanken möchte ich mich ebenso bei Frau **Rosi Kromas** für ihre Anleitung und fortlaufende Hilfsbereitschaft in der Zellkultur.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Brockhoff/Wege mit allen Doktorand/Innen für die tolle und kollegiale Arbeitsatmosphäre, die interessanten Gespräche in den regelmäßigen Arbeitsgruppenmeetings und vor allem den großen Zusammenhalt im Team.

Abschließend möchte ich mich auch bei meiner **Familie** bedanken, die mir erst das Medizinstudium ermöglicht und mich durch die gesamte Studien- und Promotionszeit begleitet hat. Zu guter Letzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Freundin **Sabine** für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft, die mich immer wieder motivierte und mit zahlreichen Ratschlägen unterstützte.



